

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

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

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ

ВАК Scopus®

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL



ФРТ 6

БУДУЩЕЕ
БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

**Предсказание фармакокинетических профилей
по данным *in vitro***

Том 13, № 3. 2024
Volume 13, No. 3. 2024



ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») – сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств, что является крайне актуальным с учетом действующих государственных программ развития фармацевтической промышленности (Фарма-2030)

Основными видами деятельности центра являются:

- БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проводятся методами ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-УФ, ИФА и др. с помощью валидированных методик анализа. Выполнение исследования и подготовка отчетности (отчет о валидации, аналитический отчет, архив хроматограмм) проводится в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов в Евразийском Экономическом Союзе, а также Руководствами ЕМА и FDA.

- ОПИСАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Расчет фармакокинетических параметров, параметров биоэквивалентности и дисперсионный анализ проводится при помощи программного обеспечения R project (лицензия GPL-2/GPL-3) с расширением bear. Программа полностью валидирована относительно современного коммерческого программного обеспечения (WinNonlin/SAS). Анализ непараметрической статистики проводится при помощи программы IBM SPSS.

Область сертификации:

- научно-исследовательская работа;
- проведение биоаналитических исследований;
- проведение фармакокинетических исследований;
- определение противолечкарственных антител к биологическим лекарственным препаратам.



ООО «ЦФА»
117149, город Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

Тел.: +7 (499) 281-81-11

www.cpha.ru E-mail: info@cpha.ru

ООО «ЦФА» первым в России среди биоаналитических лабораторий был сертифицирован по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарта). Область сертификации: научно-исследовательская работа; проведение биоаналитических исследований; проведение фармакокинетических исследований; проведение ТСРП (тест сравнительной кинетики растворов); определение противолечкарственных антител к биологическим лекарственным препаратам.

За весомый вклад за развитие российской экономики, добросовестную уплату налогов, достижение высоких экономических показателей, выразившихся в достижении лидирующего места в отраслевом рейтинге на основании отчетности Федеральной статистической службы Российской Федерации ОКВЭД 72.19 «Научные исследования и разработки в области естественных и технических наук прочие»



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2024. Том 13, № 3

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2024. Volume 13, No. 3

Цели и задачи журнала

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

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 ГХР-окружении. Журнал принимает к рассмотрению обзорные и экспериментальные статьи по данной тематике. К публикации в журнале приглашаются как отечественные, так и зарубежные исследователи в области разработки и регистрации лекарственных средств.

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

Скорик Ю. А. – доц., к. х. н., руководитель лаборатории природных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН; заведующий научно-исследовательским химико-аналитическим отделом Национального медицинского исследовательского центра имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

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

Бахрушина Е. О. – к. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

Белобородов В. Л. – д. фарм. н., профессор кафедры химии Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, Москва, Россия

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

Бобкова Н. В. – доц., д. фарм. н., профессор кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, Москва, Россия

Ваизова О. Е. – доцент, д. м. н., профессор кафедры фармакологии ФБГОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», Томск, Россия

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

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

Джупарова И. А. – доцент, д. фарм. н., заведующий кафедрой управления и экономики фармации, медицинского и фармацевтического товароведения ФБГОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», Новосибирск, Россия

Емшанова С. В. – д. фарм. н., АО «Биэнергия»; руководитель отдела разработки, профессор кафедры промышленной фармации НИЯУ МИФИ, Москва, Россия

Зарубина И. В. – профессор, д. биол. н., старший преподаватель, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Министерства обороны Российской Федерации, Москве, Россия

Ивкин Д. Ю. – к. б. н., доцент, начальник центра экспериментальной фармакологии, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия

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

Каракулова Е. В. – д. фарм. н., доцент, профессор кафедры управления и экономики фармации ФБГОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», Томск, Россия

Комаров Т. Н. – к. фарм. н., директор исследовательского центра ООО «ЦФА», Москва, Россия

Крикова А. В. – д. фарм. н., доцент, зав. кафедрой управления и экономики фармации, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, Смоленск, Россия

Куркин В. А. – д. фарм. н., профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия

Лаврентьева Л. И. – доцент, д. фарм. н., заведующий кафедрой управления и экономики фармации ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ярославль, Россия

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

Медведев Ю. В. – к. фарм. н., доц. кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, Москва, Россия

Мельников Е. С. – к. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

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

Напалкова С. М. – профессор, д. биол. н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФБГОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия

Оборотова Н. А., проф., д. фарм. н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина», Москва, Россия

Ордабаева С. К. – проф., д. фарм. н., заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии АО «Южно-Казахстанская медицинская академия», Шымкент, Казахстан
Пожарицкая О. Н. – к. фарм. н., старший научный сотрудник Мурманского морского биологического института РАН (ММБИ РАН), Мурманск, Россия
Попов В. В. – д. м. н., профессор кафедры терапии с курсом фармакологии Медицинского института непрерывного образования, ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ». Врач – Клинический фармаколог ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» имени Н. А. Семашко», Москва, Россия
Русинов В. Л. – чл. корр. РАН, д. х. н., директор Химико-технологического института ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия
Селиванова И. А. – проф., д. фарм. н., профессор кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия
Сливкин А. И. – проф., д. фарм. н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия
Смехова И. Е. – доц., профессор кафедры технологии лекарственных форм ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государствен-

ный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия
Станишевский Я. М. – проф., д. х. н., директор Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, Москва, Россия
Сысуев Б. Б. – доц., д. фарм. н., руководитель Центра фармацевтической разработки и инновационных лек. форм Сеченовского университета, Москва, Россия
Тернинко И. И. – доцент, д. фарм. н., начальник Испытательной лаборатории, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия
Тринеева О. В. – д. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия
Шиков А. Н. – д. фарм. н., профессор кафедры технологии фармацевтических препаратов ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия
Wrood S. Al-Khfajy (Ирак) – д. фарм. н., Assistant professor, Department of Pharmacology and toxicology, College of Pharmacy, Mustansiriyah University, Багдад, Ирак

ISSN 2305-2066 (Print)

ISSN 2658-5049 (Online)

Учредители печатной версии	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1
	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, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1
Издатель	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1
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
Адрес редакции	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Россия, 117246, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1 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, 2024
Условия распространения материалов	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License 
Тираж	999 экземпляров
Цена	Свободная

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

Focus and Scope of the journal

Research and production peer-reviewed journal **"Drug Development & Registration"** (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) is an up-to-date quarterly free application publication and information portal for Professionals involved in the circulation of medicines. Journal is designed for pharmaceutical manufacturers and their employees from the departments of development, quality control, registration, production and development; employees of laboratory centers, contract research organizations, scientific and educational institutions. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of drug development and registration, to increase the scientific and practical qualifications of specialists in the field of drug circulation. The main **five thematic sections** of the journal "Drug development & registration" (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) include the development lifecycle of a drug product from its creation to obtaining a marketing authorization.

The first section is devoted to the research and development of new medicines.

The second section one provides information about pharmaceutical technology, pharmaceutical ingredients, and equipment for drug development.

The third section describes analytical quality control methods.

The fourth section is devoted to approaches to evaluating the efficacy and safety of medicines, conducting clinical and preclinical studies.

The fifth section deals with the validation of methods, preparation of the registration dossier, the life cycle of the drug product in the GxP environment. Journal accepts for consideration both review and original papers. Both domestic and foreign researchers in the field of drug development and registration are invited to publication in the journal.

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

Vitaliy V. Khutoryanskiy – Prof., Cand. of Sci. (Chem.), University of Reading, Reading, United Kingdom

Rouslan I. Moustafine – as., Cand. of Sci. (Chem.), Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia

Yury A. Skorik – as., Cand. of Sci. (Chem.), Institute of Macromolecular Compounds of RAS; Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

Editorial board

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

Elena O. Bakhrushina – Cand. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Vladimir L. Beloborodov – Dr. of Sci. (Pharm.), Institute of Pharmacy named after A. P. Nelyubina Sechenov University, Moscow, Russia

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

Natalia V. Bobkova – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Institute of Pharmacy named after A. P. Nelyubina Sechenov University, Moscow, Russia

Olga E. Vaizova – as., Dr. of Sci. (Med.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Konstantin S. Guzev – Dr. of Sci. (Pharm.), Retinoids Pharmaceutical Research and Production Company (Retinoids JSC), Moscow, Russia

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

Irina A. Dzhuparova – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Svetlana V. Emshanova – Dr. of Sci. (Pharm.), JSC "Binergy"; National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

Irina V. Zarubina – Prof., Dr. of Sci. (Biol.), S. M. Kirov Military Medical Academy, Moscow, Russia

Dmitry Yu. Ivkin – Cand. of Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Elena I. Kalenikova – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Elena V. Karakulova – Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Timofey N. Komarov – Cand. of Sci. (Pharm.), LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", Moscow, Russia

Anna V. Krikova – Dr. of Sci. (Pharm.), Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

Vladimir A. Kurkin – Dr. of Sci. (Pharm.), Samara State Medical University, Samara, Russia

Larisa I. Lavrenteva – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

Evgeniya A. Malashenko – Cand. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Yury V. Medvedev – Cand. of Sci. (Pharm.), Institute of Pharmacy named after A. P. Nelyubina Sechenov University, Moscow, Russia

Evgeny S. Melnikov – Cand. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Igor I. Miroshnichenko – Dr. of Sci. (Med.), Mental Health Research Center, Moscow, Russia

Svetlana M. Napalkova – Prof., Dr. of Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Natalia A. Oborotova – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), National Medical Research Center for Oncology named after N. N. Blokhin, Moscow, Russia

Saule K. Ordabaeva – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), JSC «South Kazakhstan Medical Academy», Shymkent, Kazakhstan

Olga N. Pozharitskaya – Cand. of Sci. (Pharm.), Murmansk Marine Biological Institute of the RAS, Murmansk, Russia

Vladimir V. Popov – Dr. of Sci. (Med.), Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH). Clinical Hospital "RZD-Medicine" named after N. A. Semashko, Moscow, Russia

Vladimir L. Rusinov – RAS c.-m., Dr. of Sci. (Chem.), Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia

Irina A. Selivanova – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

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

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

Yaroslav M. Stanishevskiy – Prof., Dr. of Sci. (Chem.), Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia

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

Inna I. Terninko – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

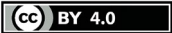
Olga V. Trineeva – Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

Alexander N. Shikov – Dr. of Sci. (Pharm.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Wrood S. Al-Khfaj – Dr. of Sci. (Pharm.), Assistant professor, Department of Pharmacology and toxicology, College of Pharmacy. Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq

ISSN 2305-2066 (Print)

ISSN 2658-5049 (Online)

Print version founders	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia Siberian State Medical University Address: 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia
Online version founders	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia
Publisher	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, 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
Editorial office address	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, 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, 2024
Content distribution terms	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License 
Circulation	999 copies
Price	Free

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

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции	10
От редакции	36
Поиск и разработка новых лекарственных средств	
Компонентный состав суммарных фракций флавоноидов некоторых видов семейства вересковых и их влияние на NO-стимулирующую активность перитонеальных макрофагов	
Я. Е. Решетов, А. А. Лигачева, Е. С. Трофимова, Н. С. Селиванова, С. В. Кривошеков, Е. В. Басова, Е. Ю. Шерстобоев, Е. Ю. Авдеева, И. П. Каминский, М. Г. Данилец, М. В. Белоусов	39
Фармацевтическая технология	
Оценка высвобождения лекарственных веществ из мягких лекарственных форм и прогнозирование проницаемости через кожный барьер (обзор)	
Н. Б. Мельникова, И. А. Шеферов, А. А. Емашева, А. А. Шеферова, Д. А. Пантелеев, А. И. Сливкин	52
Исследование субстанции с анизодиаметрической формой кристаллов	
Г. В. Трусов, Б. В. Бровченко, Ж. М. Козлова, И. И. Краснюк	66
Разработка технологии получения медицинской терапевтической биodeградируемой системы в виде полимерных микроигл для доставки белковых препаратов	
М. С. Золотарева, В. В. Чуриков, А. В. Панов, С. А. Кедик	75
Масштабирование процесса нанесения пленочных покрытий на примере витаминно-минеральных комплексов: от идеи до валидации процесса	
А. В. Стрелкова, Е. В. Флисюк	85
Eudragit® ЕРО, модифицированный группами 4-фенилбороновой кислоты, как новый полимерный носитель с улучшенными мукоадгезивными свойствами	
Д. С. Гордеева, Ш. Ф. Насибуллин, А. Г. Карпов, В. В. Хуторянский, Р. И. Мустафин	93
Методы анализа лекарственных средств	
Анализ распределения и персистентности фосфорорганических пестицидов малатиона и диазинона в лекарственном растительном сырье	
А. М. Савватеев, О. В. Фатееenkova, А. В. Браун, В. Л. Белобородов, И. В. Гравель	103
Разработка и валидация методики количественного определения субстанции аморфного дарунавира методом УФ-спектрофотометрии	
М. А. Мандрик, И. А. Садковский, Е. Д. Пинегина, Л. А. Король, И. И. Краснюк	117
Идентификация метаболитов лютеолин-7-глюкозида после перорального введения и разработка методики их количественного анализа	
Г. В. Адамов, О. Л. Сайбель, А. Н. Бабенко, Е. С. Мельников, А. И. Радимич, О. Ю. Куляк, Л. В. Крепкова	126
Исследование возможности контроля производства препаратов низко-молекулярного гепарина отечественными тест-системами (обзор)	
А. Л. Берковский, Е. В. Сергеева, А. В. Суворов	138
Доклинические и клинические исследования	
Биорелевантный тест для таблеток подъязычных с глицином в среде растворения «искусственная слюна»	
С. Д. Куликова М. Б. Сокол, Ж. М. Козлова, П. А. Лосенкова, П. Я. Паршинова, А. М. Полуянов	146
Проведение физиологически релевантного теста для таблеток кладрибина	
П. А. Лосенкова, Д. Д. Гвоздев, А. В. Суворова, Ю. В. Медведев, В. С. Щербакова, Ю. Г. Казаишвили, К. Я. Заславская, А. М. Полуянов, И. Е. Шохин	156

Применение физиологически релевантного тестера (ФРТ) для предсказания фармакокинетических профилей в рамках исследования биоэквивалентности препарата деферазирокс А. В. Суворова, П. А. Лосенкова, Ю. В. Медведев, Е. А. Малашенко, И. Е. Макаренко, А. М. Полуянов, И. Е. Шохин	166
Подходы к проведению физиологически релевантного теста (ФРТ) при изучении лекарственных препаратов, содержащих вещество подкласса IIc БКС, на примере сорафениба А. В. Суворова, Ю. В. Медведев, П. А. Лосенкова, О. С. Крамаренко, Е. А. Малашенко, А. М. Полуянов, И.Е. Шохин	176
Применение <i>in vitro</i> исследований для предсказания фармакокинетики таблеток ривароксабана А. В. Суворова, П. А. Лосенкова, Ю. В. Медведев, Е. А. Малашенко, К. К. Карнакова, Н. С. Багаева, А. Ю. Савченко, А. М. Полуянов, И. Е. Шохин	186
Количественное определение феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различных процедурах экстракции И. И. Мирошниченко, А. И. Платова, И. И. Кузьмин, Д. В. Иващенко	199
Роль доксорубина в формировании кардиотоксичности – консенсусное заявление. Часть II. Кардиотоксичность доксорубина, не связанная с миоцитами, и стратегия кардиопротекции (обзор) Д. А. Андреев, Е. И. Балакин, А. С. Самойлов, В. И. Пустовойт	208
Разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме лабораторных животных И. И. Яичков, М. К. Корсаков, А. А. Шетнев, Н. Н. Вольхин, С. С. Петухов	219

CONTENTS

Introduction	10
Events	36
Research and development of new drug products	
The component composition of the total flavonoid fractions from some <i>Ericaceae</i> family and their effect on the NO-stimulating activity of peritoneal macrophages Yaroslav E. Reshetov, Anastasia A. Ligacheva, Evgenia S. Trofimova, Natalia S. Selivanova, Sergey V. Krivoshchekov, Elena V. Basova, Evgeniy Yu. Sherstoboev, Elena Yu. Avdeeva, Ilya P. Kaminsky, Marina G. Danilets, Mikhail V. Belousov	39
Pharmaceutical Technology	
Evaluation of drug release from topical dosage forms and permeability prediction through the skin barrier (review) Nina B. Melnikova, Ilya A. Sheferov, Anastasia A. Emasheva, Alyona A. Sheferova, Dmitry A. Panteleev, Aleksey I. Slivkin	52
Technology criteria for the manufacturing of Rebamipide film-coated tablets German V. Trusov, Bogdan V. Brovchenko, Zhanna M. Kozlova, Ivan I. Krasnyuk	66
Design of scalable manufacturing process for the production of biodegradable polymeric microneedles for protein transdermal drug delivery Mariia S. Zolotareva, Vladislav V. Churikov, Aleksey V. Panov, Stanislav A. Kedik	75
Scale-up of the film coating process using the example of vitamin and mineral complexes: from idea to process validation Anna V. Strelkova, Elena V. Flisyuk	85
Eudragit® EPO, modified with 4-phenylboronic acid groups, as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties Daria S. Gordeeva, Shamil F. Nasibullin, Alexander G. Karpov, Vitaliy V. Khutoryanskiy, Rouslan I. Moustafine	93
Analytical Methods	
Analysis of the distribution and persistence of organophosphorus pesticides malathion and diazinon in herbal plants Alexey M. Savvateev, Olga V. Fateenkova, Arkady V. Braun, Vladimir L. Beloborodov, Irina V. Gravel	103
Development and validation of UV-spectrophotometry method for quantitative determination of amorphous darunavir Mark A. Mandrik, Ivan A. Sadkovskii, Elizaveta D. Pinegina, Ludmila A. Korol, Ivan I. Krasnuk	117
Identification of luteolin-7-glucoside metabolites after oral administration and development of a method for their quantitative analysis Grigori V. Adamov, Olga L. Saybel, Alexandra N. Babenko, Evgeniy S. Melnikov, Andrey I. Radimich, Olesya Yu. Kulyak, Lyubov V. Krepkova	126
Study of the possibility of controlling the production of low-molecular-weight heparin preparations by domestic test systems (review) Aron L. Berkovsky, Elena V. Sergeeva, Alexander V. Suvorov	138
Preclinical and clinical study	
A biorelevant test for tablets glycine sublingual in the "simulated saliva" dissolution medium Sofya D. Kulikova, Maria B. Sokol, Zhanna M. Kozlova, Polina A. Losenkova, Polina Ya. Parshinova, Andrey M. Poluyanov	146
Performing a physiologically relevant test for cladribine tablets Polina A. Losenkova, Danila D. Gvozdev, Alexandra V. Suvorova, Yuri V. Medvedev, Victoria S. Shcherbakova, Yuri G. Kazaishvili, Kira Ya. Zaslavskaya, Andrey M. Poluyanov, Igor E. Shohin	156

PRT to predict pharmacokinetic profiles as part of a bioequivalence study of the drug deferasirox Alexandra V. Suvorova, Polina A. Losenkova, Yuri V. Medvedev, Eugenia A. Malashenko, Igor E. Makarenko, Andrey M. Poluyanov, Igor E. Shohin	166
Approaches to conducting a physiologically relevant test (PRT) in the study of medicines containing substance IIc of the BCS subclass using sorafenib as an example Alexandra V. Suvorova, Yuri V. Medvedev, Polina A. Losenkova, Olga S. Kramarenko, Eugenia A. Malashenko, Andrey M. Poluyanov, Igor E. Shohin	176
Application of <i>in vitro</i> studies to predict the pharmacokinetics of rivaroxaban tablets Alexandra V. Suvorova, Polina A. Losenkova, Yuri V. Medvedev, Eugenia A. Malashenko, Ksenia K. Karnakova, Natalia S. Bagaeva, Alla Yu. Savchenko, Andrey M. Poluyanov, Igor E. Shohin	186
Quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at different extraction procedures Igor I. Miroshnichenko, Angelina I. Platova, Ivan I. Kuzmin, Dmitriy V. Ivaschenko	199
The role of doxorubicin in the formation of cardiotoxicity is a consensus statement. Part II. Cardiotoxicity of doxorubicin unrelated to myocytes and cardioprotection strategy (review) Dmitry A. Andreev, Evgenii I. Balakin, Alexander S. Samoilov, Vasily I. Pustovoit	208
Development and validation of the method of quantification of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in laboratory animal plasma Ilya I. Yaichkov, Mikhail K. Korsakov, Anton A. Shetnev, Nikita N. Volkhin, Sergey S. Petukhov	219

Редакционная статья / Editorial article

Алексей Иванович Сливкин (к 80-летию со дня рождения)

15 июня 2024 года исполняется 80 лет со дня рождения заведующего кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета профессора, доктора фармацевтических наук, заслуженного работника высшей школы Российской Федерации Алексея Ивановича Сливкина.

Alexey I. Slivkin (to the 80th anniversary of the birth)

On 15 June 2024, Alexey Ivanovich Slivkin, the head of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology of the Faculty of Pharmacy, Voronezh State University, Professor, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Honored Worker of Higher Education of the Russian Federation turns 80 years old.



Сливкин Алексей Иванович

В 1964 году **Алексей Иванович** окончил среднетехнический факультет Воронежского технологического института по специальности «технология органического синтеза и синтез каучука», после чего работал на Нововоронежской атомной электростанции в должности радиохимика.

В 1965 году он поступил на химический факультет Воронежского государственного университета, где сразу начал активно заниматься научно-исследовательской работой в области изучения структурно-функциональных свойств мономеров и полимеров на основе углеводов на кафедре химии высокомолекулярных соединений под руководством своего Учителя, профессора Б. И. Михантьева. С 1970 года и по настоящее время **Алексей Иванович** непрерывно работает в Воронежском государственном университете сначала инженером, старшим инженером в проблемной лаборатории химии высокомолекулярных соединений, а с 1980 года руководит отделом полимерных систем и их дисперсий в НИИ химии ВГУ. В этом же году он защитил кандидатскую диссертацию, посвященную вопросам создания новых гидрофильных полиэлектролитов медицинского назначения.

Научные интересы **Алексея Ивановича** всегда были связаны с синтезом и исследованием лекарственных средств, полимеров, углеводов и других биологически активных веществ. Он занимался изучением закономерностей синтеза органических соединений, обладающих антибактериальными, иммуностимулирующими, анальгетическими свойствами; созданием, исследованием свойств полимеров медицинского назначения на основе винильных мономеров углеводов и лекарственных форм на их основе. За 70–80-е годы XX века в этой области им было получено 25 авторских свидетельств с внедрением ряда из них на химико-фармацевтическом заводе «Акрихин» и заводе электровакуумных приборов. **Алексей Иванович** плодотворно сотрудничал с НИИ онкологии Министерства здравоохранения СССР, Всесоюзным НИИ бруцеллеза и туберкулеза и НИИ незаразных болезней животных, Московским НИИ туберкулеза. В 1986 году за достижения в науке **Алексею Ивановичу** было присвоено ученое звание стар-

шего научного сотрудника, а в 1994 году – ученое звание доцента.

С 1992 года **Алексей Иванович** выполнял обязанности заместителя декана химического факультета по научной работе, возглавлял отделение «Фармация» при химическом и биолого-почвенном факультетах. **Алексее Ивановичу** принадлежит главенствующая роль в становлении и развитии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета, деканом которого он являлся с 1998 по 2022 год. В 1998 же году **Алексеем Ивановичем** была основана кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии, которой он заведует по настоящее время.

Активно сотрудничая с научной фармацевтической школой академика А. П. Арзамасцева ММА им. Сеченова, в 2001 году Алексей Иванович защитил докторскую диссертацию по специальности «фармацевтическая химия и фармакогнозия» и стал первым доктором фармацевтических наук в регионе. В 2003 году получил второе высшее образование по специальности «фармация» и ученое звание профессора.

Алексей Иванович всегда говорит, что без научной работы нет преподавателя. Сам он является признанным ученым в области фармацевтических наук, одним из ведущих экспертов конкурсных и грантовых проектов по направлению исследований, связанных с поиском, созданием, изучением новых лекарств. Под его руководством защищено 8 кандидатских и 3 докторских диссертации. **Алексей Иванович** – автор более 900 научных статей, 6 монографий, а также 35 учебных пособий, 9 из которых получили гриф УМО по медицинскому и фармацевтическому образованию. Является членом диссертационных советов при РУДН, Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале Волгоградского государственного медицинского университета, заместителем главного редактора журнала «Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация», членом редколлегий журналов «Фармация», «Разработка и регистрация лекарственных средств», «Сорбционные и хроматографические процессы», белорусского фармацевтического журнала «Вестник фармации».

Алексей Иванович – высококлассный преподаватель. Он всегда с душой и творчески подходит к педагогической работе, уделяя внимание не только обучению студентов, но и воспитательной работе, делая большой акцент на патриотическом воспитании молодежи. На фармацевтическом факультете Воронежского государственного университета **Алексей Иванович** читает курсы «Фармацевтическая химия», «Полимеры в фарма-

ции», «Химия и технология эластомеров», «Биофармацевтический анализ», «Стандартизация лекарственных средств».

Профессионализм **Алексея Ивановича** высоко оценен на государственном уровне. В марте 2023 г. указом президента России **Алексее Ивановичу Сливкину** присвоено почетное звание «Заслуженный работник высшей школы Российской Федерации».

Сотрудники фармацевтического факультета Воронежского государственного университета поздравляют уважаемого **Алексея Ивановича** с Юбилеем! **Алексей Иванович** – прекрасный руководитель, наставник, один из ведущих ученых современного фармацевтического сообщества! Сильный и волевой, мудрый и рассудительный, справедливый и порядочный, талантливый и эрудированный – все это про нашего дорогого **Алексея Ивановича**!

В день Вашего юбилея желаем Вам идти путем процветания и с верой в прекрасное проходить все повороты судьбы. Желаем никогда не сдаваться, покорять все новые вершины и добиваться поставленных целей! Пусть любимая работа Вам всегда приносит радость и удовольствие, а ваши профессиональные знания, большой опыт, мудрое, чуткое руководство и новые полезные идеи позволяют достигать нам в нашей совместной деятельности высоких результатов! Пусть Вас всегда по достоинству ценят и уважают! Желаем Вам бодрого настроения, оптимизма, благополучия! Пусть сбудется все то, что еще не сбылось! Пусть жизнь преподносит приятные сюрпризы! Пусть грозы никогда не гремят над вами! Пусть солнце освещает теплом и светом вашу семью, близких и любимых!

Коллектив кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного университета

Глубокоуважаемый Алексей Иванович!

В день Вашего юбилея примите наши искренние поздравления с этой знаменательной датой. Ваша неиссякаемая жизненная энергия и научная активность являются надежным ориентиром в жизни для Ваших коллег, друзей и единомышленников. Являясь достойным продолжателем научных и педагогических традиций выдающегося ученого, академика РАМН Александра Павловича Арзамасцева, Вы являетесь основоположником своей собственной научной школы, которая по праву носит Ваше имя и является одной из ведущих научных школ в области фармацевтических наук. Будучи человеком, заложившим основы фармацевтического образования на территории Черноземья, стоя у истоков создания фармацевтического факультета одного из ведущих классических университетов страны, Вы воспитали не одно поколение учеников и сподвижников, достойно продолжающих Ваше дело.

Коллектив Центра Фармацевтической Аналитики от всего сердца поздравляет вас с юбилеем, желает не останавливаться на достигнутом, а также крепкого здоровья – важного спутника в осуществлении поставленных целей. Мы высоко ценим и уважаем сотрудничество с Вами лично и с коллективом возглавляемой Вами кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного университета!

С глубочайшим уважением, главный редактор доктор фармацевтических наук Шохин Игорь Евгеньевич, коллектив ООО «ЦФА», редакционная коллегия и редакция журнала!



Шохин Игорь Евгеньевич



Дорогой Алексей Иванович!

От всей души поздравляю Вас с 80-летием!

Вы являетесь одним из ведущих ученых в России в области фармацевтической химии и фармацевтической технологии.

Вся история фармацевтического факультета Воронежского государственного университета неразрывно связана именно с Вашим именем. Являясь деканом фармацевтического факультета Воронежского государственного университета с момента его основания в 1997 году на протяжении 25 лет и заведующим кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии с 1998 года, Вы основали уникальную научно-педагогическую фармацевтическую школу, внесшую огромный вклад в подготовку провизоров и научно-педагогических кадров!

Вы являетесь визитной карточкой не только воронежской фармации, но и всей нашей страны.

Будучи членом УМО по фармацевтическим и медицинским направлениям Минздрава РФ, членом двух диссертационных советов, Вы вносите большой вклад в развитие фармацевтического образования и фармацевтической науки. Вами подготовлены 4 доктора наук и 7 кандидатов наук.

Вызывает также восхищение широта Ваших научных интересов: фармацевтический анализ, фармацевтическая технология, экология, исследования закономерностей в ряду «структура – биологическая активность», синтез и выделение биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья.

Вы являетесь автором более 300 научных статей и учебных изданий, широко известных фармацевтической общественности.

Мы искренне рады Вашим успехам и выдающимся достижениям!

Высоко ценим наше сотрудничество, взаимную поддержку, доверие, наши научные связи и человеческие отношения!

Алексей Иванович, я благодарен судьбе за то, что нас связывает не только многолетнее сотрудничество, но и дружба!

От всей души желаю Вам и всему Вашему замечательному коллективу процветания, новых творческих успехов, крепкого здоровья и благополучия!

С глубоким уважением, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации профессор В. А. Куркин



Куркин Владимир Александрович

15 июня 2024 года исполняется 80 лет со дня рождения профессора, доктора фармацевтических наук Алексея Ивановича Сливкина.

После окончания школы **Алексей Иванович** учился на среднетехническом факультете Воронежского технологического института по специальности «технология органического синтеза и СК», затем поступил на химический факультет Воронежского государственного университета.

По словам **Алексея Ивановича**, знаковыми фигурами в его жизни являются два человека: профессор Б. И. Михантьев, открывший всю многогранность и сложность химии высокомолекулярных соединений, и академик РАМН, профессор А. П. Арзамасцев, превративший классическую фармацевтическую химию в четкую содержательную парадигму академической науки, впитавшей все современные достижения естествознания. Знакомство с этими незаурядными людьми определило сферу научных интересов **Алексея Ивановича**.

Активно занимаясь научной деятельностью, **Алексей Иванович** плодотворно сотрудничал с ведущими НИИ страны: НИИ онкологии МЗ СССР, Московским НИИ туберкулеза, НИИ незаразных болезней животных и др.

Накопленный практический опыт в области исследований закономерностей синтеза наиболее эффективных противотуберкулезных средств, анальгетиков, стимуляторов иммунитета был применен **Алексеем Ивановичем** в подготовке кадров на кафедре органической химии и химии ВМС Воронежского государственного университета.

Усилиями Алексея Ивановича в 1993 году в Воронеже открылось межвузовское фармацевтическое отделение, а в 1998 году под руководством **Алексея Ивановича** был создан фармацевтический факультет, деканом которого он был избран.

Алексей Иванович является автором более 500 публикаций, 5 монографий, 15 учебных пособий. Под его руководством защищено значительное количество кандидатских и докторских диссертаций.

Алексей Иванович был частым и дорогим гостем фармацевтического факультета МГМУ

им. И. М. Сеченова, а в настоящее время и Института фармации им. А. П. Нелюбина, где в течение многих лет проходил школу мастерства и перенимал традиции научной, педагогической, деловой, воспитательной направленности своего учителя академика РАМН, профессора А. П. Арзамасцева.

Деловая активность и профессиональные навыки **А. И. Сливкина** способствуют дальнейшему развитию множественных связей между фармацевтическим факультетом ВГУ и Институтом фармации им. А. П. Нелюбина.

В этот знаменательный день желаем **Алексею Ивановичу Сливкину** – Ученому и Педагогу, посвятившему свою жизнь служению науке, подготовке и воспитанию молодого поколения специалистов и ученых, – крепкого здоровья, творческих свершений, верности традициям и счастья!

Коллектив Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского Университета



Раменская Галина Владиславовна

Видеопоздравление с юбилеем
Алексея Ивановича Сливкина



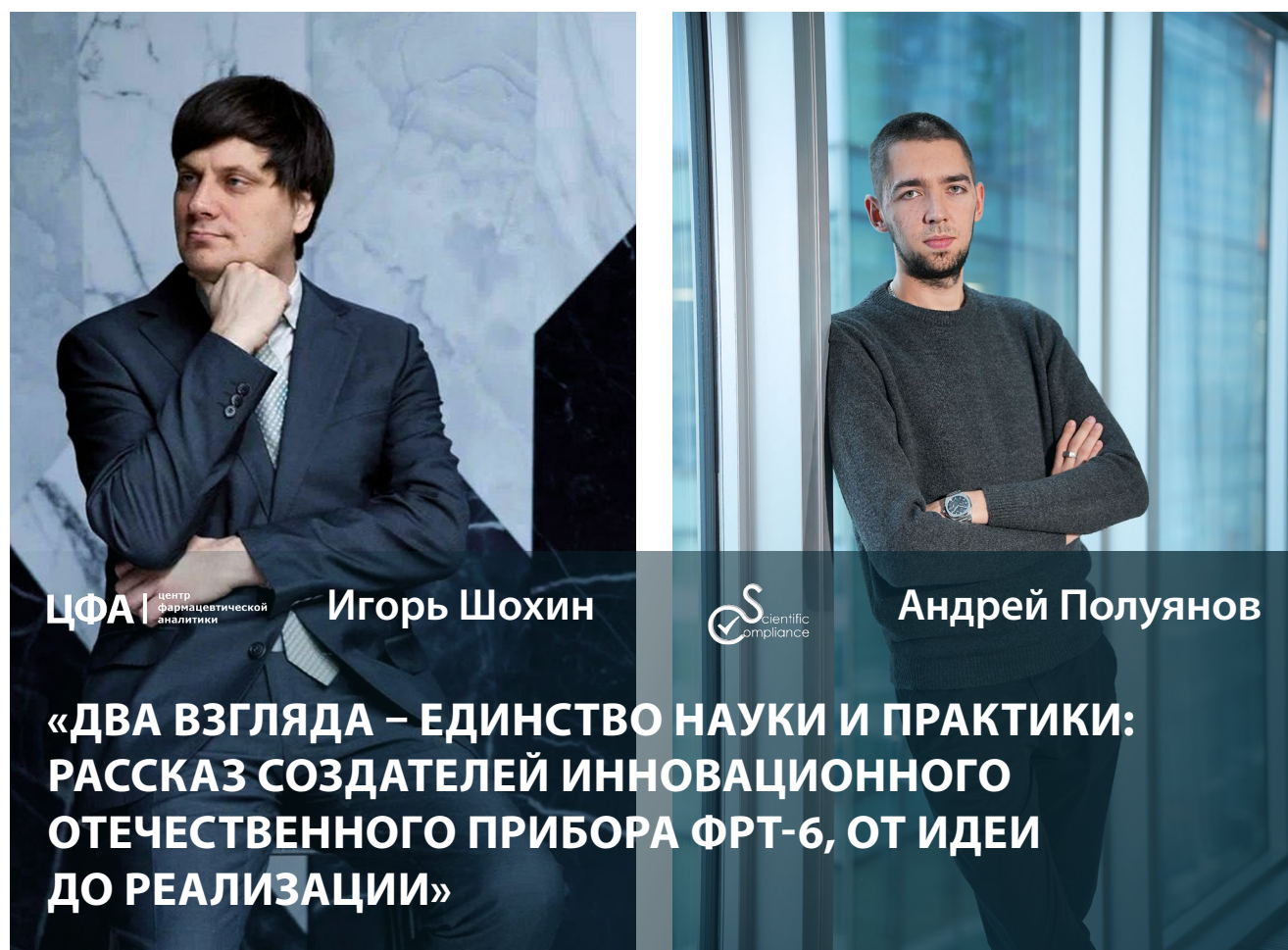
Редакционная статья / Editorial article

Интервью в рамках цикла «Мнение лидеров»

Представляем вашему вниманию новое интервью в рамках цикла «Мнение лидеров». Очередными гостями цикла стали создатели аппарата для проведения физиологически релевантного теста генеральный директор ООО «ЦФА», главный редактор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» доктор фармацевтических наук Шохин Игорь Евгеньевич и генеральный директор ООО «Сайнтифик Комплайнс» Полуянов Андрей Михайлович.

Interview as Part of the "Leadership Opinion" Series

We present to your attention a new interview as part of the Leaders' Opinion series. The next guests of the series were the creators of the apparatus for conducting a physiologically relevant test General Director of LLC "CPHA", editor-in-chief of the journal "Drug development & registration", Doctor of Pharmaceutical Sciences Igor E. Shokhin and General Director of LLC "Scientific Compliance" Andrey M. Poluyanov.



ЦФА | центр фармацевтической аналитики | **Игорь Шохин**

Scientific compliance | **Андрей Полуянов**

**«ДВА ВЗГЛЯДА – ЕДИНСТВО НАУКИ И ПРАКТИКИ:
РАССКАЗ СОЗДАТЕЛЕЙ ИННОВАЦИОННОГО
ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРИБОРА ФРТ-6, ОТ ИДЕИ
ДО РЕАЛИЗАЦИИ»**

Новый выпуск интервью из цикла «Мнение лидеров» стал довольно нетипичным: один вопрос, но такие разные ответы. Мы поговорили с генеральным директором ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохиним Игорем Евгеньевичем** и генеральным директором ООО «Сайнтифик Комплайнс» **Полуяновым Андреем Михайловичем**.

Пресс-служба ЦФА: Расскажите, как родилась идея создания аппарата ФРТ?

Игорь Евгеньевич: Всю свою научную карьеру я занимался тестом сравнительной кинетики растворения и исследованиями биоэквивалентности, то

есть проверкой эквивалентности воспроизведенных лекарственных средств сначала в условиях *in vitro* (в стакане теста растворения), а затем в условиях *in vivo* (в рамках клинического исследования биоэквивалентности на здоровых добровольцах). Исследование биоэквивалентности – это дорогое и сложное исследование. Оно может длиться от 9 до 12 месяцев, а стоить приблизительно 10 миллионов рублей. К сожалению, не всегда удается доказать эквивалентность препаратов. Примерно каждый десятый препарат в клинике оказывается неэквивалентным, что является большим ударом для фармацевтической

компании и производителя. На данный момент нам нельзя допускать такие риски с учетом курса страны на обеспечение технологического суверенитета и импортозамещения. Классический ТСКР должен моделировать три основных отдела ЖКТ: желудок натошак, двенадцатиперстную кишку, тонкий кишечник. Несмотря на то что такая модель робастна, эффективна и проверена годами, 100 % гарантии от провала она не дает. Поэтому стало очевидно, что нужно придумать и внедрить новый метод моделирования.

Андрей Михайлович: Со своей стороны скажу, что я начинал карьеру будучи лаборантом в подразделении компании, где проводились тесты для твердых лекарственных форм, непосредственно руками выполнял ТСКР. Этот ценный опыт помог в дальнейшем при создании нового аппарата, не только надежного и эффективного, но вместе с тем удобного для исследователя, с высоким уровнем автоматизации.

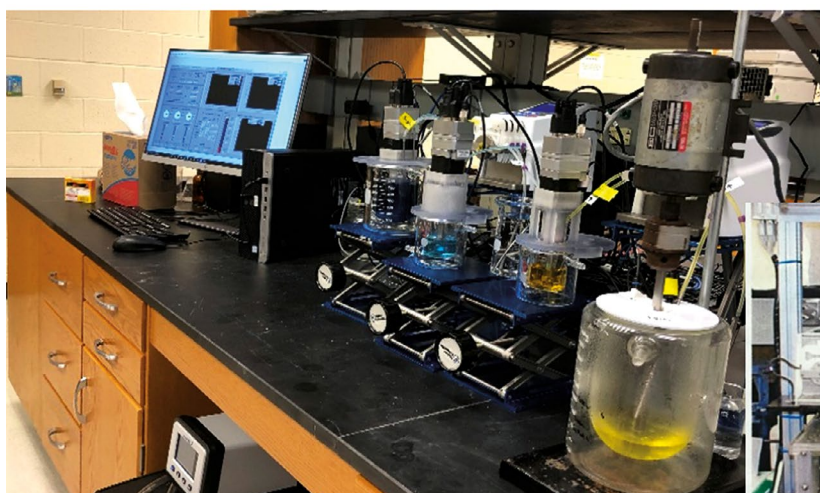
Пресс-служба ЦФА: *Какие методы моделирования проведения лекарственных средств в ЖКТ применяются в настоящее время? В чем состоит принципиальный прорыв в этом вопросе при использовании ФРТ?*

Игорь Евгеньевич: Все началось порядка 50 лет назад с появления классического теста «Растворение». Когда таблетка помещается в стакан, туда добавляется определенная среда, включается температура 37 градусов, запускается мешалка или корзинка. В определенный момент времени отбирается проба, чтобы оценить, растворилось вещество или нет. Впоследствии тест активно эволюционировал. Появил-

ся тест кинетики растворения, когда оценивают не по одной точке, а по профилю. После чего появился тест в нескольких средах растворения. Три классические среды, которые сейчас используются в регуляторных документах в Евразийском экономическом союзе, – это среды с pH 1,2, pH 4,5 и pH 6,8, которые отражают pH разных отделов ЖКТ. Но ТСКР не стоял на месте. Далее появились биорелевантные среды растворения, которые по своему составу должны более точно отражать содержимое ЖКТ (желудок, кишечник натошак и после еды). На этом наука не остановилась и продолжала совершенствовать методики. Дошло все до того, что некоторые компании создавали огромные стенды, например компания «TNO» собрала на стенде из трубок и каналов искусственный желудочно-кишечный тракт человека.

К сожалению, такие приборы оказались очень дорогостоящими и не были внедрены в производственную практику. Все шло к тому, что нужно было придумать что-то новое, и этим новым как раз стал Gastro-Intestinal Simulator (GIS). Это научное направление курировал профессор Мичиганского университета Гордон Амидон – создатель биофармацевтической классификационной системы (БКС), которого можно считать отцом нынешней биофармации. Все его идеи были реализованы в аппарате GIS (рисунок 1), но, к сожалению, проект не был завершен, так как Амидон в 80 лет вышел на пенсию, а его ученики не продолжили его работу. Мы решили продолжить это направление. Принципиальный прорыв при использовании физиологически релевантного

Gastrointestinal Simulator: GIS 2.0



GIS1.0

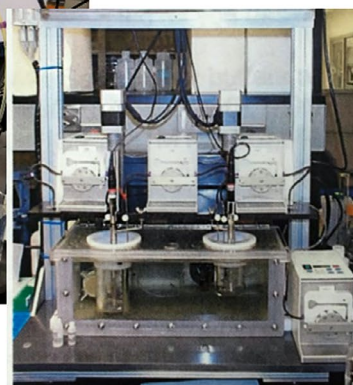


Рисунок 1. Аппарат GIS профессора Гордона Амидона

Figure 1. Professor Gordon Amidon's GIS apparatus

тестера состоит в том, что это должен быть достаточно простой в эксплуатации, недорогой и робастный прибор с понятными характеристиками. С другой стороны, он должен отражать, в отличие от классического ТСКР, все остальные критические и реальные условия ЖКТ, а именно такие параметры, как реальный объем сред камер ЖКТ, реальный состав с точки зрения pH, ионной силы и поверхностно-активных веществ, а также реальную моторику ЖКТ. В дальнейшем он должен имитировать такие аспекты процесса, как дуоденогастральный рефлюкс, а в перспективе – проницаемость через мембрану энтероцитов тонкого кишечника. Прибор должен повторять физиологический транзит, то есть моделировать не просто нахождение таблетки в желудке или кишечнике, а ее продвижение по желудочно-кишечному тракту. Все это реализовано в аппарате ФРТ.

Андрей Михайлович: В рамках опыта работы, относящегося к данному исследованию, мы почерпнули лучшее из внедрений Гордона Амидона и дополнительно усовершенствовали различные элементы прибора: например, добавили вторую линию для одновременного проведения эксперимента для тестового и референтного препаратов в одинаковых условиях. Все блоки прибора автоматизированы, а физиологический транзит, который является ключевой особенностью данного прибора, реализован при помощи перистальтических насосов, которые перемещают жидкость от первого отдела (желудка) до последнего (тонкого кишечника). Что касается биорелевантных сред растворения, то это обязательное условие для проведения физически релевантного теста, и наша компания является производителем порошка SC Powder для их приготовления (рисунок 2).



Рисунок 2. Порошок для приготовления биорелевантных сред растворения SC Powder

Figure 2. Powder for the preparation of biorelevant dissolution media SC Powder

Ранее Игорь Евгеньевич упомянул, что особенностью данного аппарата являются более низкие объемы по сравнению с классическими тестами. Для реализации текущей задачи были использованы новые подходы, например иной размер стаканов, которые вмещают в случае желудка 300 мл, двенадцатиперстной кишки – 75 мл (данный объем является постоянным на протяжении всего теста), а третий стакан, имитирующий кишечник, в начале теста пустой, но на протяжении эксперимента заполняется содержимым из двенадцатиперстной кишки, объем которого доходит до уровня 390 мл и выше. Хочется отметить, что длительность проведения испытания значительно выше, чем в классических тестах *in vitro*, и составляет порядка 80 минут и более. Что касается перемешивания, в приборе реализована отличная от USP II форма лопастей, которую непосредственно внедрял в свой аппарат Амидон. Также одним из элементов, значительно облегчающих жизнь исследователей, является блок автоматического отбора проб, который позволяет существенно снизить нагрузку на аналитика при проведении теста.

Пресс-служба ЦФА: С какими трудностями пришлось столкнуться при создании приборов?

Игорь Евгеньевич: На создание прибора от идеи до реализации ушло порядка полутора лет. Пришлось пройти через многое, создать несколько прототипов. Я хотел бы отметить: с научной точки зрения, оказывается, не всегда можно быстро и легко найти данные о реальной физиологии желудочно-кишечного тракта человека. Такие данные, как скорость, опорожнение желудка, объемы транзита, реальные значения pH натощак и после еды, как оказалось, отличаются от опубликованных в литературе данных, частота и объемы дуоденогастрального рефлюкса – в норме. Перед тем как передавать на реализацию инженерам, пришлось проработать большой объем специфической медицинской физиологической литературы.

Андрей Михайлович: Помимо этого, возникли трудности с инженерной точки зрения. С учетом отсутствия у нашей команды опыта по созданию подобных приборов были изучены существующие аппараты, которые применяются для тестов *in vitro*, например тестеры растворения производства ERWEKA, Agilent Technologies и китайских разработчиков. Основной проблемой было создание уникальных компонентов, в том числе перистальтических насосов, являющихся сердцем прибора и обеспечивающих физиологический транзит и автоматический отбор, корпуса прибора и различных механизмов, отвечающих за перемещение составных частей аппарата. Отдельной важной задачей было программирование прибора с целью автоматизации работы таким образом, чтобы он сохранял воспроизводимость результатов, но при этом был гибким в настройках.

Пресс-служба ЦФА: Какие результаты уже были достигнуты при применении метода ФРТ в биомоделировании?

Игорь Евгеньевич: Хотелось бы отметить, что наша компания обладает достаточно уникальным ресурсом – парами препаратов, эквивалентность которых не была доказана в условиях *in vivo* в рамках клинических исследований биоэквивалентности. Мы по результатам исследований знаем процент этих различий. Соответственно пары этих же лекарственных препаратов, относящиеся к разным классам и подклассам БКС, мы изучали с использованием аппарата ФРТ. Фактически эти лекарственные средства выступили «калибраторами» прибора, благодаря которым мы смогли настроить основные характеристики его работы. Основным результатом было появление первых количественных корреляций. Не просто качественных, которых можно достичь в биорелевантных средах, а количественных корреляций с достаточно невысокой степенью ошибки. Все результаты у нас будут представлены на презентации прибора. В первую очередь это относится к проблемным и высокорисковым препаратам второго и четвертого класса биофармацевтической классификационной системы.

Андрей Михайлович: Отдельно хочется отметить, что данный прорыв был достигнут с учетом применения физиологически обоснованного фармакокинетического моделирования (ФОФМ). Данная математическая обработка отличается от методологии, которая используется при интерпретации данных, полученных в рамках испытаний ТСКР, поскольку

классические методы оценки эквивалентности профилей, например фактор сходимости (f_2), неприменимы в связи с параболической формой профиля.

По результатам ФОФМ, проведенного для пар препаратов, содержащих такие МНН, как эторикоксиб, ралтегравир, монтелукаст, деферазирокс, сорафениб, ривароксабан, были предсказаны фармакокинетические профили по результатам *in vitro*. Часть этих работ будет в дальнейшем опубликована. И что самое ценное, эти данные можно сопоставить с фармакокинетическими профилями на клиническом этапе и сделать вывод о качественной и количественной корреляции полученных результатов.

Пресс-служба ЦФА: Каковы перспективы применения ФРТ при разработке лекарственных средств?

Игорь Евгеньевич: Я считаю, что перспективы применения ФРТ при разработке лекарственных средств крайне широки. Очевидно, что нашей стране необходимо обеспечить технологический суверенитет в сфере разработки и производства лекарственных средств. У нас, как говорится, нет другого выбора. Конечно, недопустимо, когда компания вкладывает деньги в разработку препарата, тратит время и ресурсы, выходит на клинику, тратятся годы на проведение исследований, и этот проект проваливается. Качество, эффективность, безопасность и эквивалентность препарата должны быть обеспечены уже на этапе фармацевтической разработки и подтверждены в клинике. Возможно, это звучит амбициозно, но я считаю, что тестер ФРТ в перспективе должен стоять на каждом предприятии, произво-



Рисунок 3. Различные прототипы прибора ФРТ-6

Figure 3. Various prototypes of the FRT-6 apparatus

дящем твердые лекарственные формы, для снижения этих рисков.

Андрей Михайлович: Отдельно хочется отметить, что данный прибор особенно актуален для тех компаний, которые стремятся к высокому качеству конечного продукта. И несмотря на несколько большие затраты на этапе разработки, все сполна возвращается на последующих этапах проведения исследований.

Пресс-служба ЦФА: Что вы можете посоветовать молодым ученым, создающим стартапы и новые разработки в фармацевтической отрасли?

Игорь Евгеньевич: Коллеги, конечно, всегда хочется поделиться своим опытом с молодыми учеными. Главное, не бойтесь братья, не бойтесь трудностей, не жалейте своих усилий и ресурсов. Надо понимать, что на ранних этапах на свою идею нужно потратить чуть больше сил, чтобы она «выстрелила». Когда-то и ночью в лаборатории остаться, когда-то и засидеться допоздна. Собрать команду таких же энтузиастов, которые заряжены идеей и доверяют друг другу, продолжать держаться своей цели. И у вас обязательно будет результат!

Андрей Михайлович: Со своей стороны скажу, что реализация такой амбициозной задачи, как создание своего прибора, невозможна без команды единомышленников, для которых это является делом жизни, а не просто работой. Это те люди, которые действительно готовы задерживаться на работе, изучать на досуге информацию по поставленной задаче. Отдельно хочется отметить, что нам, в свою очередь, помогло достичь значительного прогресса отсутствие бюрократии и высокая работоспособность, с учетом того, что компания достаточно маленькая и все мысли можно реализовать на практике здесь и сейчас. Наука – это та отрасль, где невозможно продвижение без ошибок и неудач, которые являются точкой роста. Могу сказать, что наша команда совершала ошибки, пробовала снова и снова, чтобы достичь того конечного результата, который устраивал бы как меня, так и людей, которые этим занимаются. И создание данного прибора – это не просто выполненный проект, это неоценимый опыт, новые компетенции и понимание того, что нет ничего невозможного при должном усердии, грамотном планировании и командном подходе (см. рисунок 3)!



Редакционная статья / Editorial article

УДК 615.11

Аптекарский приказ – зарождение и становление.

Часть 2

К. С. Гузев✉

АО «Ретиноиды», 143989, Россия, Московская обл., мкр. Керамик, г. Балашиха, ул. Свободы, д. 1А, оф. 404

✉ Контактное лицо: Гузев Константин Сергеевич. E-mail: guzev3@yandex.ru

Резюме

Во второй части статьи представлена структура Аптекарского приказа в момент его окончательного становления. Обращено внимание на кадры, служившие в Приказе. Перечислены руководители Приказа с момента его возникновения и до его окончательной реорганизации, а также должности основного и вспомогательного персонала. Разобраны основные функции Аптекарского приказа, которые традиционно разделяются на дворцовые и государственные. К первой группе относят лечебную, ветеринарную, заготовительную, садоводческую, экспертную и производственную функции. К общегосударственным относятся медико-полицейская, военно-медицинская, образовательная и управленческая функции. Особый интерес представляет функция Аптекарского приказа по сбору, хранению и изучению научных сочинений по медицине.

The apothecary order – the origin and formation.

Part 2

Konstantin S. Guzev✉

JSC «Retinoids», off. 404, 1A, Svobody str., Balashikha, Ceramic microdistrict, Moscow Region, 143983, Russia

✉ Corresponding author: Konstantin S. Guzev. E-mail: guzev3@yandex.ru

Abstract

The second part of the article presents the structure of the Apothecary order at the time of its final formation. This publication also focuses on the personnel who served in the organization. The chiefs of the Apothecary order are listed from the moment of its setting up until its final reorganization, as well as the positions of the main and auxiliary personnel. The functions of the Apothecary order, which are traditionally divided into palatial and state, are analyzed. The first ones include medical, veterinary, purveyance, horticultural, expert and production functions. The state ones are constabulary-medical, military-medical, educational and administrative functions. The particular interest consists in the special function of the Apothecary prikaz – the collection, storage and study of scientific works on medicine.

СТРУКТУРА АПТЕКАРСКОГО ПРИКАЗА

В момент окончательного становления Аптекарского приказа как государственного учреждения он состоял из канцелярии, аптекарского двора, аптекарского огорода и аптекарской казны.

Канцелярия – присутственное место, в котором дьяки и подьячие вели обширное делопроизводство.

Аптекарский двор – производственный комплекс, где располагались различные строения, необходимые для изготовления лекарств (поварни, сушильни) и хранения сырья для них.

Аптекарские огороды – специально выделенные земельные участки, на которых выращивались лекарственные растения, используемые для производства лекарств.

Аптекарская казна – склады, где хранились готовые медицинские препараты, купленные или изготовленные сотрудниками Аптекарского приказа и предназначенные для безденежной выдачи государю, членам его семьи или боярам ближнего круга.

КАДРЫ АПТЕКАРСКОГО ПРИКАЗА

На службе в Аптекарском приказе состояло большое количество народа, выполняющего различные виды работ. Условно всех работающих можно разделить на руководство, основной и вспомогательный персонал.

В разное время Аптекарским приказом руководили особо приближенные к царю бояре, князья и дьяки, не имевшие какого-либо медицинского образова-

ния, но наделенные специальными полномочиями. В таблице 1 представлены имена руководителей Аптекарского приказа, обнаруженные нами в различных источниках.

Указанные даты не обозначают точных пределов времени начала и конца службы руководителей Аптекарского приказа, но указанный временной промежуток с наибольшей достоверностью охватывает названные пределы сообразно с имеющимся историческим материалом. Однако отчетливо видно, что Аптекарским приказом руководил всегда русский боярин, пользовавшийся особым доверием царя. И только Петр I нарушил эту традицию, поручив управление медицинской службы России шотландскому аристократу лейб-медику Р. К. Арескину.

Основной персонал

- ✓ Руководители Аптекарского приказа – окольные или судьи, «те, кто находится около царя», – приближенные к царю люди высокого положения, находящиеся на военной, гражданской или придворной службе. Как правило, к ним относились бояре, князья, думные дьяки, принадлежавшие к древним боярским родам Годуновых, Черкасских, Шереметевых, Милославских, Одоевских и др. Представляет интерес распределение ответственности между руководителями и исполнителями решений и приказов. Поскольку Аптекарский приказ действовал именем царя, то все жалобы и решения выносились царем, утверждались Думой и скреплялись подписью нижестоящих дьяков и подъячих. Таким образом, руководители Аптекарского приказа «своих рук к каким делам не прикладывали»¹.
- ✓ Дьяки и подьячие – государевы люди, призванные обеспечивать делопроизводство приказа. Они наблюдали за работой Аптекарского приказа, выполняя различные его функции.
- ✓ «Дохтора» – врачи по внутренним болезням, окончившие медицинские факультеты, как правило, европейских университетов, ставящие диагнозы, дающие советы и консультации по лечению, они же выписывали рецепты и следили за результатами лечения. В свою очередь, «дохтора» – окулисты, дантисты, костоправы, мастера чепучинного дела (сифилидологи), чечуйные доктора (доктора, лечащие геморрой), лекари гортанного дела, брюк-мастера (лечение грыж) – специализировались на лечении конкретных органов.
- ✓ Лекари – хирурги, не имеющие высшего медицинского образования и не обладающие правом самостоятельно лечить больных. Они выполняли назначения «докторов» и проводили хирургические операции.

¹ Соколовский М. К. Характер и значение деятельности Аптекарского приказа. СПб.: типография П. П. Сойкина; 1904. С. 84.

- ✓ Цирюльники – те, кто, помимо стрижки и бритья, могли лечить сеченые, стреляные или колотые раны, нечистую болезнь, могли вырвать зуб, отсечь конечность; как правило, они были младшими хирургами.
- ✓ Рудометы – специалисты, занимавшие срединное место между докторами и лекарями. Они пускали кровь больным по рекомендации докторов.
- ✓ Аптекари – специалисты с фармацевтическим образованием и носящие звание фармацевта. Они занимались лечением больных, участвуя в консилиумах и в приготовлении лекарств по рецептам докторов. Они следили за наличием производственного инвентаря и сырья для приготовления лекарств, организовывая его закупку. И. И. Левинштейн, цитируя древний источник, образно описывает взаимодействие между этими людьми: «дохтур совет свой дает и приказывает, а сам тому не искусен, а лекарь прикладывает (руку) и лекарством лечит, а сам ненаучен, а обтекар у них обоих – повар»². Аптекари, в свою очередь, делились на алхимистов, дистилляторов, травников, коренщиков, ягодников и т. д.
- ✓ Целовальники – выборные лица, целовавшие крест в добросовестном исполнении своих обязанностей и тщательном хранении вверенных им денег и имущества. Целовальники выбирались на год из тяглецов казенной слободы. В их обязанности входило заведование аптекарской кассой, закупка лекарственных веществ и контроль над продажей спиртных напитков (водок) частным лицам³.

Необходимо отметить, что некоторые исследователи деятельности Аптекарского приказа не оставляют без внимания вспомогательный состав этого учреждения. Отдельно изучаются и постоянно пополняются биографии «внутреннего аппарата» Приказа. Существуют специальные справочники, отражающие сведения о биографиях и сроках работы тех или иных сотрудников, по сути осуществлявших текущее делопроизводство. Тенденции последнего времени идут дальше: современные исследователи считают, что изучение деятельности приказного аппарата нельзя ограничивать только биографиями дьяков и подъячих. Количество социальных групп следует расширить. В их число включают и переводчиков, и сторожей, и истопников, и пр.

Вспомогательный персонал

- ✓ Писари – должностные лица Аптекарского приказа, занимающиеся составлением внутренних и внешних документов под руководством дьяков и подъячих.

² Левинштейн И. И. История фармации и организация фармацевтического дела. М., Л.: Медгиз; 1939. С. 94–95.

³ Лахтин М. Ю. Медицина и врачи в Московском государстве. (в до-петровской Руси). М.: Унив. тип.; 1906. С. 88.

Таблица 1. Руководители Аптекарского приказа с момента появления до момента реорганизации¹

Table 1. Heads of the Pharmacy Order from the moment of its appearance until the moment of reorganization¹

№ п/п №	ФИО Name	Период руководства Reign period
1	Боярин Афанасий Вяземский ² Boyar A. Vyazemsky ²	1581–1584 гг. 1581–1584
2	Борис Федорович Годунов Boris F. Godunov	1584–1598 гг. 1584–1598
3	Князь Иван Борисович Черкасский Prince Ivan B. Cherkassky	С 9 октября 1629 г. по 2 июля 1633 г. From October 9, 1629 to July 2, 1633
4	Боярин князь Федор Иванович Шереметев Boyar Prince Fyodor I. Sheremetev	С 19 апреля 1643 г. по 10 августа 1645 г. From April 19, 1643 to August 10, 1645
5	Боярин Борис Иванович Морозов да дьяк Микифор Вальцов Boyar Boris I. Morozov and clerk Mikifor Valtsov	С 27 мая 1646 г. по 26 июня 1648 г. From May 27, 1646 to June 26, 1648
6	Князь Яков Куденетович Черкасский Prince Yakov K. Cherkassky	С 26 июня г. по 18 июля 1648 г. From June 26 to July 18, 1648
7	Боярин Илья Данилович Милославский Boyarin Ilya D. Miloslavsky	С сентября 1651 по 18 февраля 1669 г. From September 1651 to February 18, 1669
8	Окольничий Иван Михайлович Милославский да дьяк Иван Десятов Okolnichy Ivan M. Miloslavsky and clerk Ivan Desyatov	С 3 апреля по 24 августа 1669 г. From April 3 to August 24, 1669
9	Думный дьяк Лукьян Голосов и дьяк Петр Зыков да подьячие Иван Зуев и Семен Посников Duma clerk Lukyan Golosov and clerk Pyotr Zykov and clerks Ivan Zuev and Semyon Posnikov	С 7 июля 1670 г. по 5 ноября 1671 г. From July 7, 1670 to November 5, 1671
10	Окольничий Артамон Сергеевич Матвеев и дьяк Иван Патрикеев Okolnichy Artamon S. Matveev and clerk Ivan Patrikeev	С 14 марта 1672 г. по 4 апреля 1676 г. From March 14, 1672 to April 4, 1676
11	Братья боярин князь Никита Иванович и Василий Федорович Одоевские Boyar brothers Prince Nikita I. and Vasily F. Odoyevsky	С 1 января 1677 г. по 27 мая 1688 г. From January 1, 1677 to May 27, 1688
12	Боярин князь Яков Никитич Одоевский и дьяки Иван Протопопов и Андрей Юдин Boyar Prince Yakov N. Odoyevsky and clerks Ivan Protopopov and Andrei Yudin	С начала 1689 г. по 25 мая 1697 г. From the beginning of 1689 to May 25, 1697
13	Дьяки Андрей Юдин и Иван Протопопов Deacons Andrei Yudin and Ivan Protopopov	С 22 июня 1698 г. по 21 октября 1699 г. From June 22, 1698 to October 21, 1699
14	Думный дьяк Андрей Андреевич Виниус Duma clerk Andrei A. Vinus	С 1702 по 1704 год From 1702 to 1704
15	Роберт Карлович Арескин (лейб-медик Петра I, главный начальник всей медицинской части в России) ³ Robert K. Areskin (life physician of Peter I, chief commander of the entire medical unit in Russia) ³	С декабря 1706 г. по 1718 г. From December 1706 to 1718
16	Иоганн Блюментрост ⁴ Johann Blumentrost ⁴	С 1718 по 1721 год From 1718 to 1721

Примечание. ¹ Новомбергский Н. Врачебное строение в допетровской Руси. Томск. 1907. С. 73–79.

² Аверина С. А. и др. Российский гуманитарный энциклопедический словарь. В 3. т. Москва: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС. СПб.: Филол. фак. С.-Петерб. гос. ун-т; 2002. 688 с.

³ Сытин А. К., Сластунов Д. Д. Гербарий Роберта Арескина, лейб-медика Петра Великого, архиатра. СПб.: Любавич; 2022. С. 51–68.

⁴ Там же. С. 68.

Note. ¹ Novombergsky N. Medical building in pre-Petrine Russia. Tomsk 1907. P. 73–79.

² Averina S.A. et al. Russian humanitarian encyclopedic dictionary. In 3. volume. Moscow: Humanit. ed. VLADOS center. SPb.: Philol. fak. St. Petersburg state University; 2002. 688 p.

³ Sytin A.K., Slastunov D.D. Herbarium of Robert Areskin, physician of Peter the Great, archiater. St. Petersburg: Lubavitch; 2022. P. 51–68.

⁴ Ibid. P. 68.

Таблица 2. Изменение состава служащих Аптекарского приказа

Table 2. Changes in the composition of employees of the apothecary order

Год Year	Доктор Doctor	Лекарь Healer	Аптекарь/ алхимист Pharmacist/ alchemist	Часовщик Watchmaker	Окулист Oculist	Переводчик Translator	Цирюльник Barber surgeon	Ученики лекарей, аптекарей и костоправов Students of healers, pharmacists and chiropractors
1645	3	4	2	1	1	1	–	–
1655	1	4	1	2	–	2	2	27
1656	1	4				2	1	28
1662	3	10	4/2	1	–	–	–	30
1677	3	5	2/1	–	–	–	–	4

- ✓ Помощники и ученики лекаря или аптекаря – молодые люди, постигающие азы медицинской и фармацевтической науки.
- ✓ Помясы – специалисты по сбору лекарственных растений, которые заготавливались, высушивались и в дальнейшем использовались для приготовления лекарств. Помясы делились по специализации – корнерезы, травники, ягодники. Они обслуживали потребности Аптекарского приказа и ратных лекарей. Набирали их из местных людей, знающих полезные свойства растений.
- ✓ Садовники и огородники – сотрудники Аптекарского приказа, занимающиеся организацией функционирования аптекарских огородов и выращиванием на них овощей, пряных трав и лекарственных растений.
- ✓ Толмачи и переводчики – служащие Аптекарского приказа, занимающиеся – первые – синхронным переводом при сопровождении иностранных делегаций, на консилиумах и докладах, а вторые – письменным переводом медицинских книг, писем, рецептов и других документов с греческого, латинского, арабского, а также с немецкого, французского, голландского и других европейских языков.

Кроме того, имеются сведения, что в штат Аптекарского приказа входили гончары, лудильщики, истопники, сторожа, а с 1618 г. – иконники (иконописцы)¹. В 1635 г. в Подмоскowie, в деревне Духанино, под руководством Елисея Койета было запущено производство стеклянной посуды для Аптекарского приказа. В дальнейшем этот завод со всеми работниками был приписан к этому приказу².

¹ Худин К. С. Документы аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/synopsis_pdfs/000/000/039/original/d98a91866b03b3279773b13a48daa292ea8eccc4.pdf?1632215959. Ссылка активна на 10.06.2024.

² Цейтлин М. А. Очерки по истории развития стекольной промышленности в России. М., Л.: Гизлегпром; 1939. С. 23..

Материалы М. Соколовского позволяют проследить изменение состава Аптекарского приказа на протяжении нескольких лет.

Из данных таблицы 2 видно, что состав служащих год от года сильно меняется. Относительно стабильно количество основного персонала: докторов, лекарей и аптекарей. М. Соколовский предполагает, что остальной персонал набирался в зависимости от конкретной и сиюминутной потребности³.

ФУНКЦИИ АПТЕКАРСКОГО ПРИКАЗА

Как известно, основной функцией Аптекарского приказа являлось врачевание. Однако в начале его образования Приказ выполнял две задачи, не связанные напрямую с оказанием лечебной и лекарственной помощи царской семье. М. Соколовский пишет, что вначале Аптекарский приказ, кроме заботы о «царском хозяйстве», заведовал водочными изделиями, которые сам и производил. С течением времени появляется даже особая должность мастера «водочного строения». Таковым был, например, в 1663 г. Ерофейко Мурахновский, писавший про себя: «взял я холоп твой в Аптекарский приказ для водочного построения всяких водок...». Обязанность приготовления водки ограничивается вначале потребностью царского обихода, но постепенно расширяется, и ее излишки начинают продаваться частным лицам. Из документов Аптекарского приказа начала XVII в. видно, что изначально Аптекарский приказ ведал продажей спиртных напитков частным лицам. Эта продажа проводилась под присмотром целовальников. Впоследствии водочная продажа из аптеки Приказа была прекращена, но по-прежнему продолжалась поставка водок на царский стол. М. Соколовский упоминает еще об одном непрофильном виде деятельности Приказа. Это его благотворительная деятельность. В царствовании Алексея Михайловича на аптекарском дворе была построена особая палата для кормления нищих. Она располагалась в

³ Соколовский М. К. Характер и значение деятельности Аптекарского приказа. СПб.: типография П. П. Сойкина; 1904. С. 18.

Шуйском переулке в Москве. В ней располагались 30 столов и 60 скамеек. Подобное кормление иногда проходило и на аптекарском дворе. Объяснить эту деятельность можно только тем, что царь смотрел на этот Приказ как на свой частный административный орган¹.

Последние исследования документов Аптекарского приказа позволили разделить функции этого учреждения на дворцовые и (обще)государственные. Характер этих функций обусловлен причиной его образования: либо государственной необходимостью, либо исключительной заботой о здоровье царской семьи. На протяжении длительного времени существовали группы исследователей, которые были привержены либо к первой точке зрения, либо ко второй. Однако со временем появился «примирительный взгляд», который утверждал: «Аптекарский приказ первоначально являлся придворным учреждением, обслуживающим царя, царскую семью и близких ко двору лиц, но в XVII в. он превратился в государственный центр медицинского дела»². М. Б. Мирский, согласившись с этим, дополняет: «Созданный вначале как чисто дворцовое ведомство, он очень скоро расширил свои компетенции за пределы Кремля и включил в сферу своей деятельности помимо забот о здоровье царского семейства еще и заботу о придворных царя – думных боярах, военачальниках, а затем и обо всем царском войске, и еще о многом другом»³.

Как видно, сформировавшись внутри дворцового ведомства, Аптекарский приказ неизбежно был связан с его функционированием, которое с течением времени неизбежно расширялось. Учитывая это, К. С. Худин заключает: «Аптекарский приказ проделал путь от дворцового учреждения к государственному» – и предлагает его функции разделять на управленческие и специфические⁴. Первые направлены на взаимодействие с другими приказами Московского царства и организацию внутренней канцелярской работы (прием на работу, выплата жалования, закупка бумаги, чернил и т. п.). Ко вторым автор относит функции, относящиеся исключительно к компетенции Аптекарского приказа: лечебные функции и функции, связанные с работой царской аптеки (сбор и закупка сырья для производства лекарств и процесс их приготовления).

¹ Соколовский М. К. Характер и значение деятельности Аптекарского приказа. СПб.: типография П. П. Сойкина; 1904. С. 4–7.

² Ерошкин Н. П. История государственных учреждений дореволюционной России. М.: Высшая Школа; 1983. С. 59.

³ Мирский М. Б. Медицина в России XVI–XVIII вв. Владикавказ: Рекламно-издательское агентство Госкомиздата РСО-А; 1995. С. 11–12.

⁴ Худин К. С. Документы аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/synopsis_pdfs/000/000/039/original/d98a91866b03b3279773b13a48daa292ea8eccc4.pdf?1632215959. Ссылка активна на 10.06.2024.

Так, при разборе документов, касающихся финансового взаимодействия Аптекарского приказа с другими приказами, оказалось, что за период с 1629 по 1672 год это учреждение имело взаимодействие с 31 приказом: Большого Дворца, Большого прихода, Большой казны, Земским, Иноземским, Казанского дворца, Казенным, Каменным дел, Конюшенным, Монастырским, Печатным, Поместным, Посольским, Пушкарским, Разбойным, Разрядным, Рейтарским, Сбора десятой деньги, Сибирским, Ствольного дела, Стрелецким, Холопым, Царицыной мастерской палатой, Челобитным, Ямской чети (области), Владимировской, Галицкой, Костромской, Новой, Новгородской, Устюжской. Как видно, Аптекарский приказ не занимал какого-либо особенного места, а наоборот, он взаимодействовал с большим количеством приказов и вместе с ними определял жизнь государства⁵. Такая ситуация свидетельствует о большой вовлеченности и не последней роли этого учреждения в жизни Российского государства.

Традиционно Аптекарский приказ как дворцовое ведомство выполнял следующие функции:

- лечебную, включающую заботу о жизни и здоровье царя, царицы, их детей и приближенных (обследование, диагностика, назначения, составление рецептов лекарственных средств);
- ветеринарную – лечение «государевых лошадей» и птиц;
- заготовительную – сбор лекарственного сырья;
- производственную – изготовление на аптекарском дворе различных медицинских препаратов и полуфабрикатов, а также снабжение Сытного двора произведенными на аптекарском дворе различными напитками (водками) и кушаньями (медами, сахарами и пр.), идущими к царскому столу;
- садоводческую – обслуживание царских садов и усадеб;
- экспертную – проведение осмотров для определения годности к государственной службе.

К общегосударственным относили следующие функции:

- медико-полицейскую – обеспечение карантинной защиты поселений и иных мер в условиях эпидемий;
- военно-медицинскую – обеспечение армии лекарствами, аптекарями и медикаментами;
- образовательную – подготовку учеников различных медицинских специальностей и аптекарей, а также проведение экзаменов для вновь прибывших;

⁵ Худин К. С. Документы аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/synopsis_pdfs/000/000/039/original/d98a91866b03b3279773b13a48daa292ea8eccc4.pdf?1632215959. Ссылка активна на 10.06.2024.

- управленческую – наблюдение за общиной врачей-иностранцев, регламентацию их жизни и разрешение споров в отношении лиц, находившихся под юрисдикцией Аптекарского приказа, переводческую деятельность;
- сбор, хранение и изучение научных сочинений: в специальных помещениях Аптекарского приказа хранились медицинские книги, которые поступали из-за рубежа по приказу или инициативе купцов и торговцев. Согласно сведениям М. М. Соколовского, в Приказе имелись «Благопрохладный вертоград», или «Цветник» (с выписками из сочинений Гиппократ, Галена, Диоскорида, Авиценны и других древних врачей), «Аристотелевы проблемы» – свод тогдашней анатомии и физиологии, «Учение Галиново на Иппократа» – комментарии Галена к сочинениям Гиппократ, «Лечебник строгановских лекарств» в переводе с английского, составленный по заказу богатого русского промышленника, и многие другие¹. К. С. Худин, публикуя «Алфавитный перечень лекарств с обозначением их стоимости», указывает, что в этом документе имеется запись «Фармакопея лондиненсис»². Это означает, что в Аптекарском приказе был экземпляр Лондонской фармакопеи.

Во время посещения фонда редких и ценных изданий Российской государственной библиотеки нам посчастливилось поработать с экземпляром Лондонской фармакопеи 1650 г. (*Pharmacopoeia Londinensis Collegarum*. – Londini, 1650) (рисунок 1).

¹ Соколовский М. К. Характер и значение деятельности Аптекарского приказа. СПб.: типография П. П. Сойкина; 1904. С. 11.

² Худин К. С. Документы аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/synopsis_pdfs/000/000/039/original/d98a91866b03b3279773b13a48daa292ea8eccc4.pdf?1632215959. Ссылка активна на 10.06.2024.

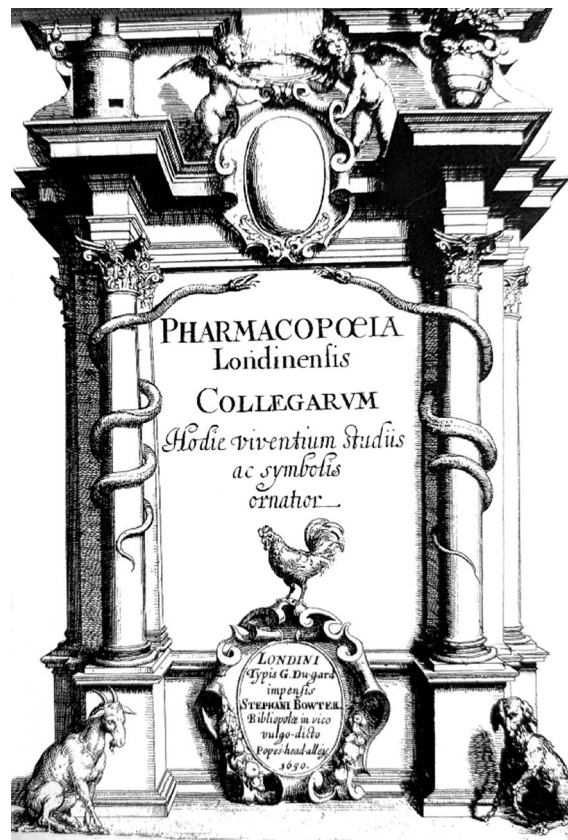


Рисунок 1. Копия титульного листа английской фармакопеи (1650 г.). Из архива Российской государственной библиотеки

Figure 1. Copy of the title page of the English Pharmacopoeia (1650). From the archives of the Russian State Library

Как видно из представленных данных, к середине XVII в. Аптекарский приказ, кроме основной своей функции охраны здоровья царя и его семьи, стал выполнять довольно много важных государственных функций.

Рекламная статья / Sponsored article

Инновационный отечественный прибор СК ФРТ-6. Предсказание фармакокинетических профилей по данным *in vitro*



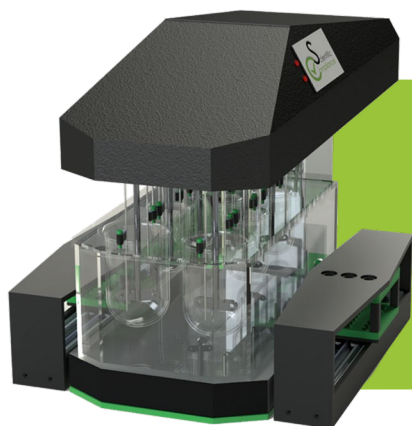
Авторы подготовили статью при финансовой поддержке ООО «Сайнтифик Комплайнс»

ФРТ является уникальной высокотехнологичной научной установкой отечественного производства, в которой, помимо прочего, реализованы идеи зарубежного научного аппарата GIS (Gastro Intestinal Simulator). Наш прибор позволяет изучить поведение таблетки или капсулы в условиях, близких к реальным для желудочно-кишечного тракта человека, и, на основании полученных в ходе теста данных, предсказать фармакокинетические профили.

Innovative domestic device SC PRT-6. Prediction of PK profiles from *in vitro* data

The authors prepared the article with the financial support of LLC "Scientific Compliance"

PRT is a unique high-tech scientific installation of domestic production, which, among other things, implements the ideas of the foreign scientific apparatus GIS (Gastro Intestinal Simulator). Our device allows us to study the behavior of a tablet or capsule under conditions close to real ones for the human gastrointestinal tract, and based on the data obtained during the test, predict pharmacokinetic profiles.



**Прибор СК ФРТ-6 – будущее
биофармацевтических
исследований**

СХЕМА РАБОТЫ

Прибор подразумевает два режима работы для веществ с различными физико-химическими свойствами, которые отражены на рисунке 1.

В бачке СК ФРТ-6 имеется 8 отверстий под стеклянные стаканы. В отверстиях оранжевого цвета размещаются стаканы объемом 1000 мл. Во все остальные помещаются стаканы объемом 300 мл.

В приборе имеются две параллельные линии, состоящие из 3 отделов, для проведения испытания в одинаковых условиях, а также две дополнительные камеры для размещения секрета для 1 и 2 отделов аппарата (рисунок 2).

В режиме работы I:

- **синие** камеры выступают в роли желудка, куда осуществляется доставка секрета из **желтой** камеры;

- **зеленые** камеры выступают в роли 12-перстной кишки, куда осуществляется доставка секрета из **красной** камеры;

- **оранжевые** камеры выступают в роли кишечника, куда происходит перекачка содержимого **зеленых** стаканов.

В режиме работы II:

- **синие** камеры выступают в роли приемника содержимого желудка, куда осуществляется перекачка из **зеленой** камеры до 40-й минуты, затем до конца теста содержимое остаётся в данной камере неизменным;
- **зеленые** камеры выступают в роли желудка в первые 40 минут теста, затем до 55-й минуты наполняются секретом из **красной** камеры, а содержимое перекачивается в оранжевую камеру;
- **оранжевые** камеры выступают в роли кишечника, куда происходит перекачка содержимого **зеленых** стаканов.

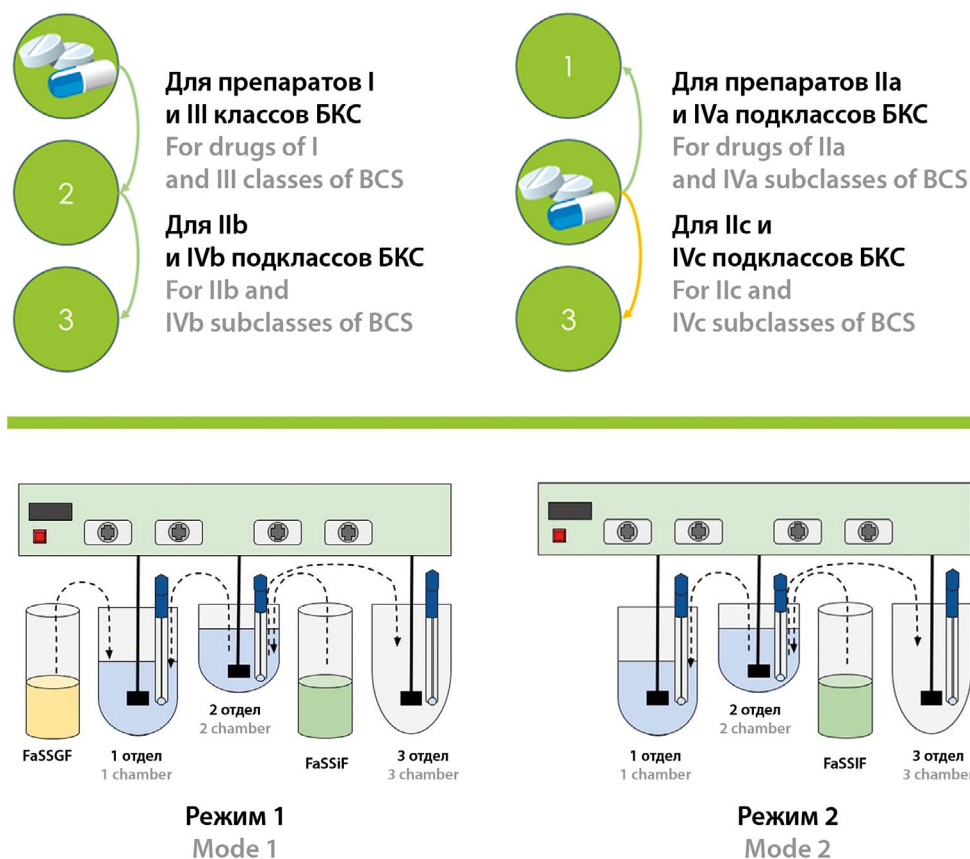


Рисунок 1. Режимы работы

Figure 1. Operation modes

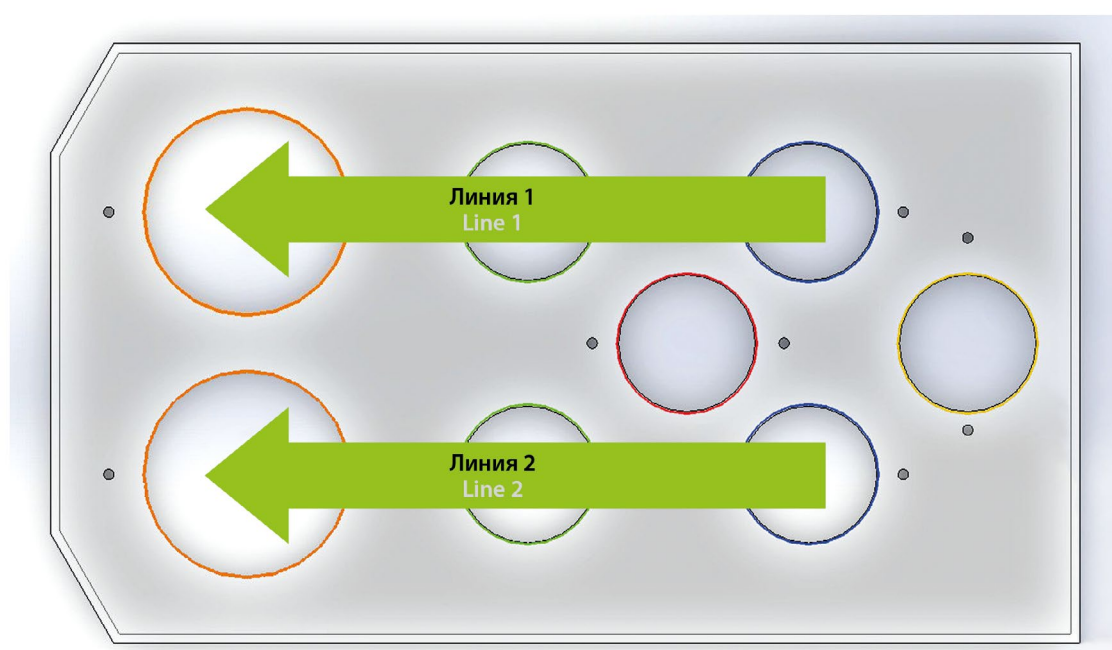


Рисунок 2. Схема размещения отделов прибора

Figure 2. Layout of the device chambers

БЛОК АВТОМАТИЧЕСКОГО ОТБОРА ОБРАЗЦОВ

Конкурентным преимуществом прибора СК ФРТ-6 является высокий уровень автоматизации, так как аппарат комплектуется двумя блоками автоматического отбора образцов (рисунок 3). Отбор проб реализуется путем вращения голов перистальтических насосов и перекачивания по металлической трубке, погруженной в стакан, содержимого каждого из 6 отделов прибора.

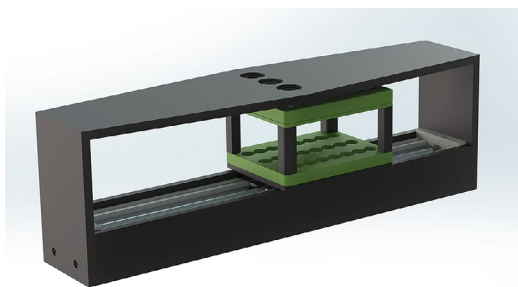


Рисунок 3. Блок автоматического отбора образцов

Figure 3. Automatic sampling unit

Каждый блок отбора имеет внешний корпус с отверстием под шприцевые фильтры диаметром 13 и 25 мм. Внутри каждого блока помещена каретка (рисунок 4), которая в автоматическом режиме перемещается после отбора образца.

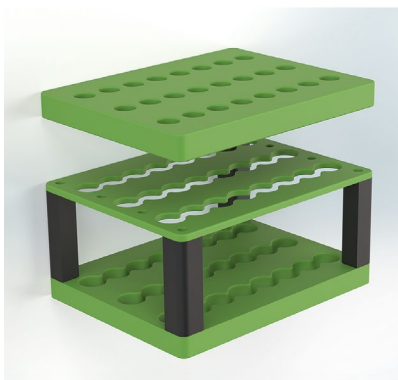


Рисунок 4. Каретка

Figure 4. Carriage

Каретка оснащена держателем образцов и насадкой под вials. Вместимость одной каретки – 24 пробирки объемом 10 мл либо 24 вials объемом 2 мл.

В программном обеспечении прибора можно задать:

- ✓ временные точки отбора образцов;
- ✓ количество точек отбора;
- ✓ объем отбора образца.

БЛОК ВРАЩЕНИЯ СТЕРЖНЕЙ

Вращение лопастей реализовано следующим образом: на вал мотора постоянного тока, осуществляющего вращение стержней, крепится зубчатый шкив, который при помощи ремней осуществляет вращение остальных, ведомых шкивов, размещенных на всех валах прибора.

Скорость вращения лопастей варьируется в диапазоне от 10 до 200 об/мин. В рамках проведения ФРТ зачастую требуется резкое ускорение вращения лопастей – «burst» – через равные промежутки времени.

Форма лопасти обеспечивает необходимую реологию в стакане

УПРАВЛЕНИЕ ПРИБОРОМ

Управление прибором осуществляется при помощи сенсорного дисплея размером 7", размещенного на корпусе.

При выборе условий испытания можно задать параметры метода: режим теста, время теста, скорость вращения лопастей, наличие «burst» ускорения, временные точки отбора и объем. Параметры, выбранные в ходе создания метода, можно сохранять в памяти прибора и использовать в дальнейшем.

ПРИМЕНЕНИЕ НА ПРАКТИКЕ

В рамках пилотных исследований на препаратах-калибраторах осуществлялась настройка прибора и подбор условий, обладающих наибольшей дискриминативностью для различных классов и подклассов биофармацевтической классификационной системы.

Все успешно проведенные исследования описаны в компендиуме, поставляемом вместе с самим СК ФРТ-6. В нем указаны условия проведения испытаний, полученные результаты, а также советы по работе с прибором.

Неотъемлемая часть испытаний – предсказание фармакокинетических профилей, для которого наша команда использует программное обеспечение PK-Sim® (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Германия). В рамках компендиума представлена краткая инструкция по использованию данного ПО.

Полученные в рамках симуляции фармакокинетические профили схожи с данными, полученными при проведении клинических испытаний, а низкая погрешность свидетельствует о достоверной оценке прогнозирования. Использование СК ФРТ-6 является залогом получения качественного и безопасного препарата при высоком уровне автоматизации и надежности.

Рекламная статья / Sponsored article

Определение N-нитрозаминов с применением газового хромато-масс-спектрометра с тройным квадруполем EXPEC G-Chrom MS марки Экспес



Авторы подготовили статью при финансовой поддержке ООО «Лабконцепт»

Фармацевтические препараты и лекарственные средства играют важную роль в поддержании здоровья человека. Однако, как и любые другие продукты, они могут содержать потенциально опасные вещества, так называемые генотоксичные примеси, которые могут нанести вред здоровью человека при их употреблении, поэтому контроль качества фармацевтической продукции имеет особое значение. Генотоксичность — это способность вещества оказывать необратимое действие на структуру и функции ДНК в клетках, тем самым вызывая гибель ДНК и ошибки в ее репликации, мутации и хромосомные aberrации. Одними из таких веществ являются N-нитрозамины, которые образуются в результате взаимодействия вторичных аминов с нитритами или нитратами. Группа компаний Лабконцепт – официальный дистрибьютор ведущих производителей аналитического и общелабораторного оборудования. Лабконцепт предлагает комплексные решения для оснащения лабораторий разных направленностей, в том числе и для фармацевтической отрасли. В данной статье мы рассмотрим возможность определения таких примесей с использованием газового хромато-масс-спектрометра с тройным квадруполем EXPEC G-Chrom MS марки Экспес на примере N-нитрозаминов.

Determination of N-nitrosamines by using triple quadrupole gas chromatography mass spectrometer EXPEC G-Chrom MS

The authors prepared the article with the financial support of LLC "Labconcept"

Pharmaceuticals and medicines play an important role in maintaining human health. However, like any other products, they may contain potentially dangerous substances the so-called genotoxic impurities which can harm human health when consumed, so quality control of pharmaceutical products is of particular importance. Genotoxicity is the ability of a substance to have an irreversible effect on the structure and functions of DNA in cells thereby causing DNA death and errors in its replication, mutations and chromosomal aberrations. One of these substances is N-nitrosamines, which are formed as a result of the interaction of secondary amines with nitrites or nitrates. The Labconcept Group is the official distributor of leading manufacturers of analytical and general laboratory equipment. The Labconcept offers comprehensive solutions for equipping laboratories of various fields, including for the pharmaceutical industry. In this article, we will consider the possibility of determining such impurities using the EXPEC G-Chrom MS triple quadrupole gas mass spectrometer using N-nitrosamines as an example.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время безопасность и качество выпускаемой продукции являются ключевыми факторами для потребителей и производителей, особое внимание уделяется контролю содержания вредных веществ в различных продуктах, включая фармацевтические препараты. Одним из таких опасных соединений являются N-нитрозамины – группа химических веществ, которые могут образовываться в результате взаимодействия нитритов или нитратов с аминами. N-нитрозамины представляют серьезную угрозу для здоровья человека, так как они обладают канцерогенными свойствами и могут вы-

зывать различные виды рака, поэтому определение N-нитрозаминов является важным этапом контроля качества фармацевтической субстанции и готовых лекарственных форм, который позволяет предотвратить поступление на рынок потенциально опасных продуктов.

Для определения N-нитрозаминов ГК Лабконцепт предлагает газовый хромато-масс-спектрометр с тройным квадруполем EXPEC G-Chrom MS марки Экспес, который обладает высокой чувствительностью и селективностью, что позволяет качественно и количественно определять наличие N-нитрозаминов на уровне следовых количеств.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- ✓ Газовый хромато-масс-спектрометр с тройным квадруполом EXPEC G-Chrom MS фирмы Экспес (рисунок 1).
- ✓ Автодозатор жидких проб AS-2000B фирмы Экспес.
- ✓ Колонка капиллярная SH-Stabilwax длиной 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазы 0,25 мкм.
- ✓ Лайнер без сброса потока, ультра инертный, с сужением с одной стороны, с кварцевой ватой.
- ✓ Аналитические весы ВЛА-225МА фирмы Госметр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий

Определение содержания N-нитрозаминов проводилось на примере NDMA (нитрозодиметиламин), NDEA (нитрозодиэтиламин), NDIPA (нитрозодиизопропиламин), NEIPA (нитрозоэтилизопропиламин) и NDBA (нитрозодибутиламин), которым уделяется особое значение (согласно ОФС.1.2.2.2.0031).

В качестве стартовых условий для проведения эксперимента были выбраны параметры из ОФС.1.2.2.2.0031 (методика 4), приведенные в таблице 1.

По итогам проведения анализа модельного раствора нитрозаминов (NDEA, NDMA и NDBA) с концентрацией 7,5 нг/мл (рисунок 2) был сделан вывод о неудовлетворительной чувствительности системы для определения следовых количеств нитро-



Рисунок 1. Газовый хромато-масс-спектрометр с тройным квадруполом EXPEC G-Chrom MS

Figure 1. Triple Quadrupole Gas Chromatography Mass Spectrometer EXPEC G-Chrom MS

заминов и необходимости подбора оптимальных условий.

Оптимальные условия проведения хроматографического анализа нитрозаминов, определенные в ходе эксперимента, представлены в таблице 2.

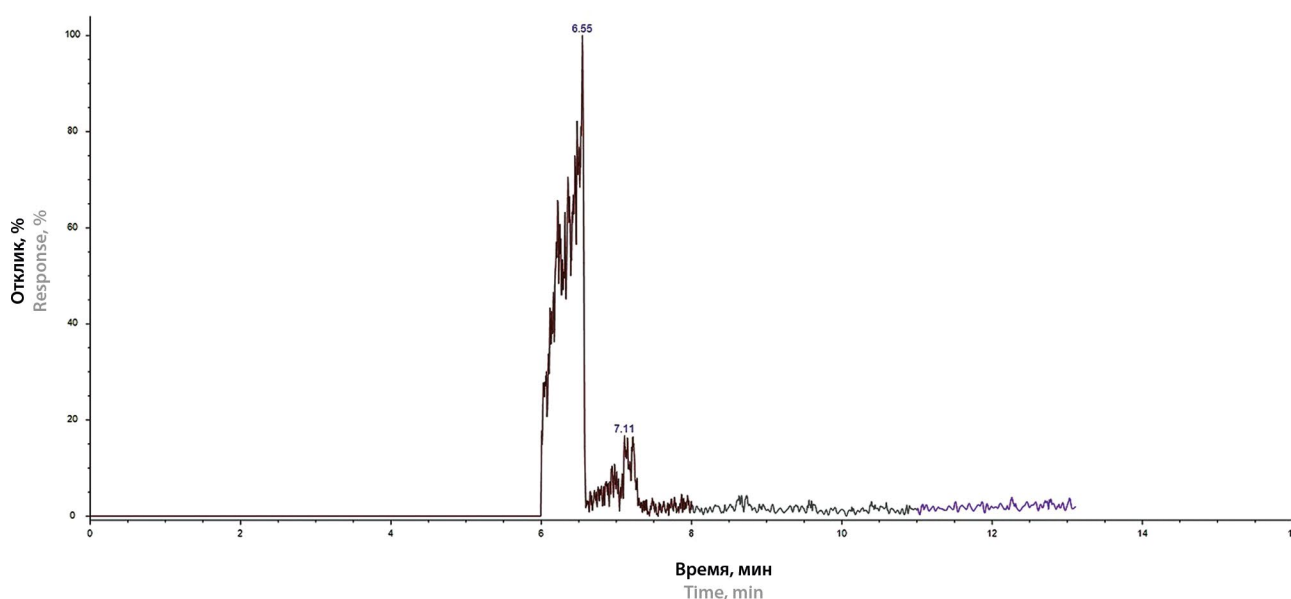


Рисунок 2. Хромограмма модельного раствора N-нитрозаминов (NDEA, NDMA и NDBA) с концентрацией 7,5 нг/мл, полученная в условиях, приведенных в таблице 1

Figure 2. Chromatogram of a model mixture of N-nitrosamines (NDEA, NDMA и NDBA) with concentration 7.5 ng/ml according to table 1

Таблица 1. Условия проведения анализа N-нитрозаминов методом газовой хромато-масс-спектрометрии согласно ОФС.1.2.2.2.0031 (методика 4)

Table 1. The Triple Quadrupole Gas Chromatograph Mass Spectrometer Operating Conditions for the analysis of N-nitrosamines according to GPA.1.2.2.2.0031 (method 4)

Условие Condition	Значение Meaning	
Колонка Column	Кварцевая капиллярная 30 м × 0,25 мм, покрытая слоем поли(цианопропилфенил)(6)(метил)(94)силоксана, 1,4 мкм Quartz capillary 30 m × 0.25 mm, coated with a layer of poly(cyanopropylphenyl)(6)(methyl)(94)siloxane, 1.4 μm	
Температура инжектора, °C Inlet temperature, °C	250	
Поток газа-носителя через колонку, мл/мин Column flow, ml/min	1,3	
Начальная температура термостата колонки, °C Initial column temperature, °C	40	
Продолжительность выдержки при 40 °C, мин Holding time at 40 °C, min	0.5	
Подъем со скоростью 60 °C до температуры, °C Rate 60 °C/min up to temperature, °C	140	
Продолжительность выдержки при 140 °C, мин Holding time at 140 °C, min	2	
Подъем со скоростью 20 °C до температуры, °C Rate 20 °C/min up to temperature, °C	180	
Продолжительность выдержки при 180 °C, мин Holding time at 180 °C, min	0,5	
Подъем со скоростью 30 °C до температуры, °C Rate 30 °C/min up to temperature, °C	240	
Продолжительность выдержки при 240 °C, мин Holding time at 240 °C, min	1,7	
Подъем со скоростью 40 °C до температуры, °C Rate 40 °C/min up to temperature, °C	280	
Продолжительность выдержки при 280 °C, мин Holding time at 280 °C, min	2,5	
Температура интерфейса, °C Interface temperature, °C	240	
Температура ионного источника, °C Ion source temperature, °C	230	
Энергия ионизации, эВ Electron energy, eV	40	
Поток газа соударения, мл/мин Collision gas flow, ml/min	1,5	
Дозируемый объем, мкл Sample volume, mkl	3	
MRM-переходы и энергии соударений MRM transitions and collision energies		
N-нитрозамин N-nitrosamine	MRM-переход MRM transition	Энергия соударения, эВ Collision energy, eV
NDMA (нитрозодиметиламин) NDMA	74–44 74–42	5 22
NDEA (нитрозодиэтиламин) NDEA	102–85 102–56	3 19
NDIPA (нитрозодиизопропиламин) NDIPA	130–88 130–71	5 14
NEIPA (нитрозоэтилизопропиламин) NEIPA	116–99 116–44	5 14
NDBA (нитрозодибутиламин) NDBA	158–141 158–99	1 7

Таблица 2. Условия проведения анализа нитрозаминов на газовом хромато-масс-спектрометре EXPEC G-Chrom MS

Table 2. The triple Quadrupole Gas Chromatograph Mass Spectrometer EXPEC G-Chrom MS Operating Conditions for nitrosamines determination

Условие Condition	Значение Meaning
Колонка Column	Колонка капиллярная SH-Stabilwax длиной 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазы 0,25 мкм SH-Stabilwax, 30 m × 0,25 mm × 0,25µm
Температура инжектора, °C Inlet temperature, °C	250
Режим инжектора Injection mode	Без деления потока Splitless
Поток газа-носителя через колонку, мл/мин Column flow, ml/min	1,0
Начальная температура термостата колонки, °C Initial column temperature, °C	40
Продолжительность выдержки при 40 °C, мин Holding time at 40 °C, min	0,5
Подъем со скоростью 20 °C до температуры, °C Rate 20 °C/min up to temperature, °C	160
Продолжительность выдержки при 160 °C, мин Holding time at 160 °C, min	0
Подъем со скоростью 60 °C до температуры, °C Rate 60 °C/min up to temperature, °C	250
Продолжительность выдержки при 250 °C, мин Holding time at 250 °C, min	2
Температура интерфейса, °C Interface temperature, °C	250
Температура ионного источника, °C Ion source temperature, °C	250
Энергия ионизации, эВ Electron energy, eV	70
Поток газа соударения, мл/мин Collision gas flow, ml/min	0,4
Дозируемый объем, мкл Sample volume, mkl	2,5

Перед построением калибровочных графиков осуществлялась оптимизация MRM-переходов с целью определения наиболее эффективных энергий соударения для улучшения чувствительности системы.

Оптимальные энергии соударения (CE) для определявшихся N-нитрозаминов представлены в таблице 3.

Таблица 3. Оптимизированные MRM-переходы для N-нитрозаминов

Table 3. Optimized MRM transitions for N-nitrosamines

N-нитрозамин N-nitrosamine	MRM-переход MRM transition	CE
NDMA (нитрозодиметиламин) NDMA (nitrosodimethylamine)	74–44	6
	74–42	22
NDEA (нитрозодиэтиламин) NDEA (nitrosodiethylamine)	102–85	5
	102–56	16
NDIPA (нитрозодиизопропиламин) NDIPA (nitrosodiisopropylamine)	130–88	6
	130–42	11
NEIPA (нитрозоэтилизопропиламин) NEIPA (nitrosoethylisopropylamine)	71–56	3
	116–99	5
NDBA (нитрозодибутиламин) NDBA (nitrosodibutylamine)	158–99,1	7
	116,1–99,1	2

После подбора оптимальных условий проведения анализа был осуществлен анализ модельных растворов N-нитрозаминов в метаноле в диапазоне концентраций 0,8 – 15 нг/мл. В соответствии с ОФС.1.2.2.2.0031 нормы содержания примесей N-нитрозаминов должны быть приведены в фармакопейной статье. В случае их отсутствия нормы содержания должны быть рассчитаны с использованием значений максимально допустимой суточной дозы. Хроматограммы модельных растворов с концентрацией 0,8 и 15 нг/мл представлены на рисунках 3 и 4 соответственно.

Построение калибровочных кривых

По итогам проведенных анализов были построены калибровочные кривые в диапазоне 0,8 – 15 нг/мл. Квадрат коэффициента линейной корреляции для всех N-нитрозаминов составил более 0,998. Калибровочные кривые для N-нитрозаминов представлены на рисунке 5.

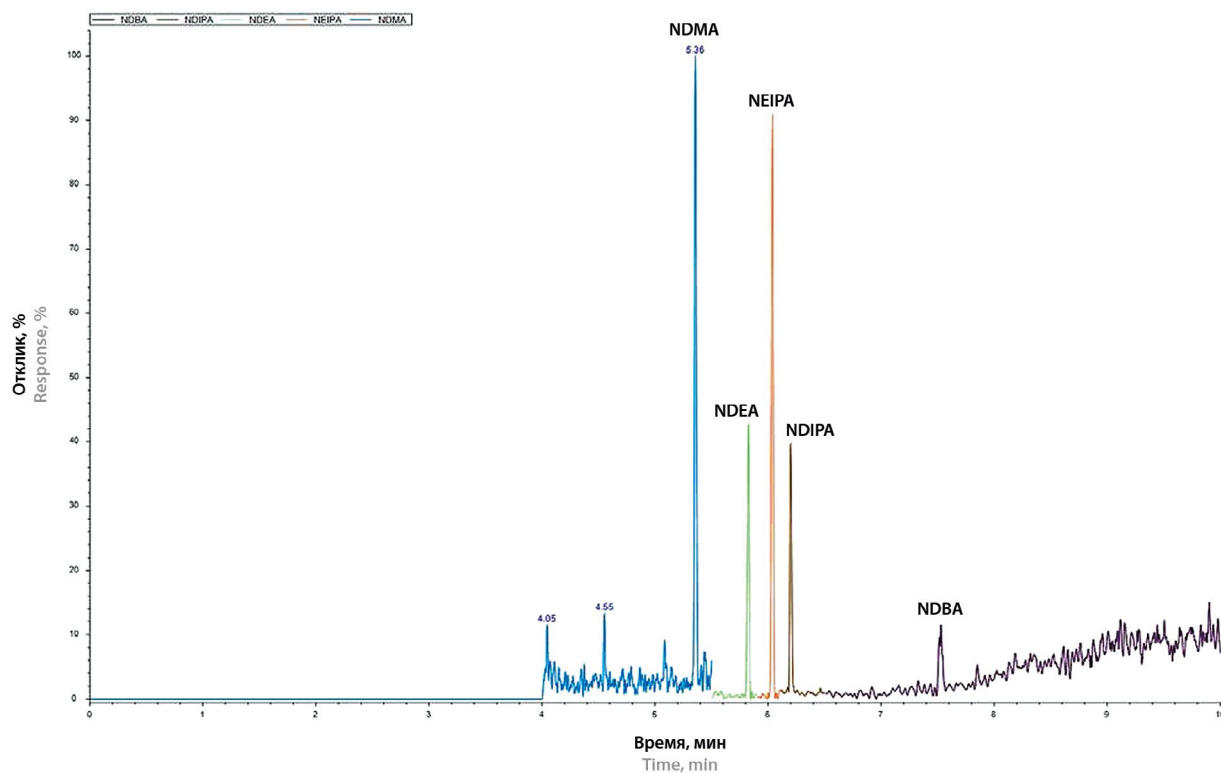


Рисунок 3. Хроматограмма модельного раствора N-нитрозаминов с концентрацией 0,8 нг/мл

Figure 3. Chromatogram of a model mixture of N-nitrosamines with concentration 0.8 ng/ml

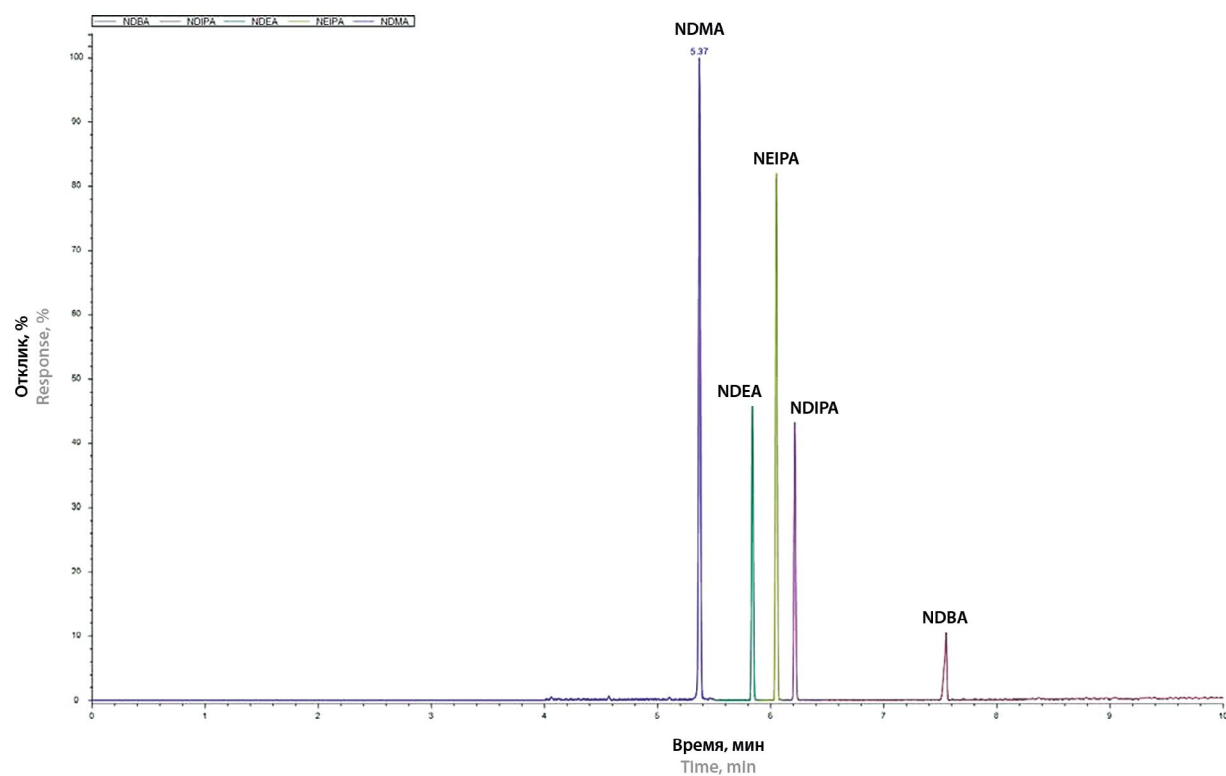


Рисунок 4. Хроматограмма модельного раствора N-нитрозаминов с концентрацией 15 нг/мл

Figure 4. Chromatogram of a model mixture of N-nitrosamines with concentration 15 ng/ml

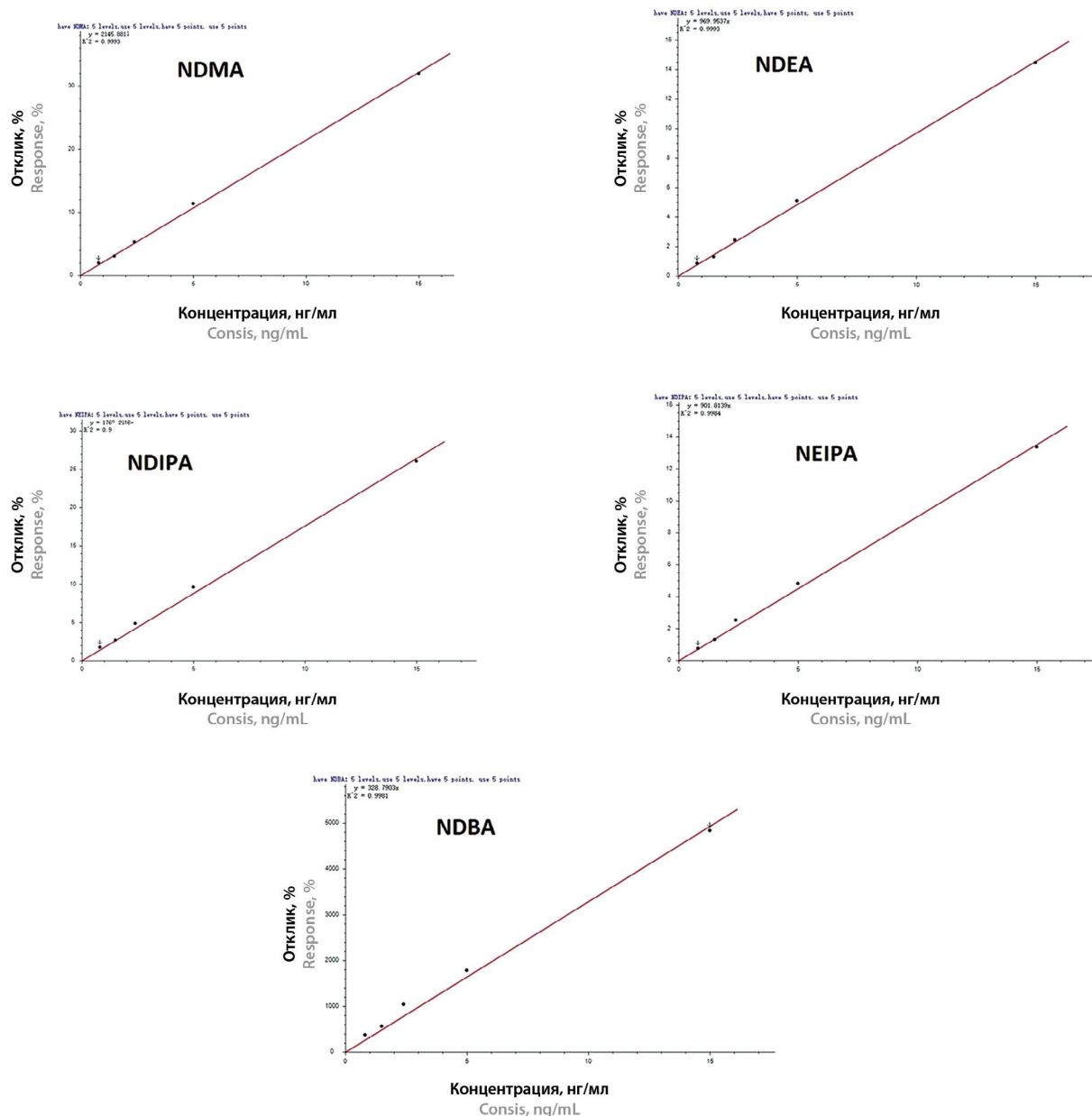


Рисунок 5. Калибровочные кривые N-нитрозаминов в диапазоне концентраций 0,5 – 15 нг/мл

Figure 5. Calibration curves of N-nitrosamines in the concentration range of 0.5 – 15 ng/mL

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что газовый хромато-масс-спектрометр EXPEC G-Chrom MS с тройным квадруполем марки Ехрес является подходящим решением в области качественного и количественного определения N-нитрозаминов в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах на следовом уровне, обеспечивая безопасность и качество выпускаемой продукции. Это делает газовый хромато-масс-спектрометр EXPEC G-Chrom MS незаменимым инструментом для контроля качества фармацевтической продукции в соответствии с требованиями Европейской и Российской Фармакопей. В конструкции газового

хромато-масс-спектрометра EXPEC G-Chrom MS используются технологии быстрой и эффективной доставки ионов в масс-анализатор без потерь, а также быстрое удаление ионов из соударительной ячейки, которые обеспечивают высокую чувствительность анализа и отсутствие «эффекта памяти», что гарантирует воспроизводимые результаты анализа даже при дозировании «грязных» проб со сложной матрицей. Программное обеспечение прибора русифицировано и имеет стандартную библиотеку методов, функцию интеллектуальной серийной обработки данных и настраиваемые пользовательские отчеты, что существенно упрощает работу оператора.



Жидкостные и газовые хромато-масс-спектрометры в фармацевтическом анализе

Анализ лекарственных препаратов:

определение состава, чистоты и подлинности лекарственных средств.

Изучение **биодоступности** и **фармакокинетики**.

Контроль нормируемых примесей в

фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах, например, потенциально генотоксичных примесей, в том числе определение N-нитрозаминов.

Метаболомные исследования: поиск лекарственных кандидатов и их оптимизация.



собственная разработка

Жидкостный хромато-масс-спектрометр EXPEC L-Chrom MS с тройным квадруполем

Газовый хромато-масс-спектрометр EXPEC G-Chrom MS с тройным квадруполем

SMMS – умное устройство для защиты вашего масс-детектора от внештатного выключения

- ✓ Тестирование каждой единицы прибора в собственном отделе технического контроля перед отгрузкой.
- ✓ Собственная действующая лаборатория в Санкт-Петербурге для осуществления оперативной методической поддержки.
- ✓ Серверное ПО собственной разработки – Space CDS (доступно в варианте standalone).
- ✓ Обучение фундаментальным основам методов ГХМС и ВЭЖХМС, а также практическим навыкам работы на приборах.
- ✓ Крупнейшая сервисная служба в РФ.

Санкт-Петербург

☎ +7 (812) 327-37-00

✉ lc@labconcept.ru

Москва

☎ +7 (495) 136-21-74

✉ msk@labconcept.ru

Нижний Новгород

☎ +7 (831) 228-80-02

✉ op_nn@labconcept.ru

Уфа

☎ +7 (347) 246-23-97

✉ op_yfa@labconcept

Казань

☎ +7 (843) 205-48-85

✉ op_kzn@labconcept.ru

Владивосток

☎ +7 (423) 230-22-23

✉ op_dv@labconcept.ru



Информационная статья / Informational article

Производство биологических лекарственных препаратов обсудили на IX Всероссийской GMP-конференции

IX Всероссийская GMP-конференция с международным участием прошла 21–23 августа в столице Республики Башкортостан – Уфе. Девиз этого года – «GMP – непрерывное развитие».

The production of biological drugs was discussed at the 9TH Pan-Russian GMP conference

The 9TH Pan-Russian GMP conference with international participation was held on August 21–23 in the capital of the Republic of Bashkortostan – Ufa. This year's motto is "GMP – continuous development".



Девиз этого года – «GMP – непрерывное развитие». Непрерывное развитие является неременным условием усиления и укрепления фармацевтической отрасли. Развитие необходимо в разработке лекарственных средств, внедрении новых технологий производства инновационных лекарственных препаратов, совершенствовании систем качества фармацевтических предприятий и, конечно, развитие касается вопросов регулирования обращения лекарственных средств. Об этом заявил на торжественном открытии IX Всероссийской GMP-конференции с международным участием директор ФБУ «ГИЛС и НП» Минпромторга России **Владислав Шестаков**.

GMP-конференция – ежегодное крупнейшее мероприятие в области надлежащих производственных практик, которое проводится с 2016 года в разных городах России. В 2024 году фармацевтическое сообщество – эксперты и регуляторы из 25 стран при участии представителя ВОЗ собрались в Уфе, чтобы обсудить векторы развития, особенности и перспективы взаимодействия в фармацевтической отрасли, специфику производства биологических и высокотехнологичных лекарственных препаратов, передовые подходы к построению системы качества.

Деловую программу мероприятия открывало пленарное заседание «Векторы развития регуляторной системы фармацевтической отрасли». Особый акцент был сделан на построении доверия между ре-

гуляторными системами разных стран. Были разобраны практические аспекты сближения регуляторных требований для преодоления экспортных барьеров, а также перспективы образования региональных союзов.

Программа этого года включала следующие тематики: взаимодействие в фармацевтической отрасли: связь государства, науки и производства; лицензирование: от подготовки документов до получения лицензии/сертификата GMP; подходы к построению фармацевтической системы качества: опыт отечественных и зарубежных производителей лекарственных средств; подготовка кадров и компетенции сотрудников в сфере GMP – от внутреннего аудита до контроля фармпредприятий и др.

В рамках GMP-конференции 2024 состоялась пленарная сессия, посвященная производству биологических лекарственных препаратов. Внимание экспертов было обращено к определению высокотехнологичных лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов. Ведущие фармацевтические производители России обменивались опытом разработки и производства препаратов крови.

Согласно практике ЕС и ЕАЭС к категории высокотехнологичные лекарственные препараты или ВТЛП относят генотерапевтические лекарственные препараты, лекарственные препараты на основе

соматических клеток, препараты тканевой инженерии. **Барановский Денис Станиславович**, заведующий лабораторией биоматериалов и тканевых конструкций МРНЦ имени А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России выступил с темой «Правовое положение препаратов генной и клеточной терапии». Денис Станиславович подробно разобрал правовые решения, существующие для клеточных препаратов. Спикер предложил гармонизировать правовые решения национального регулирования и решений ЕЭК, создав «госпитальные исключения» для ВТЛП в 61-ФЗ, а также устранить «задвоенное» регулирование: перейти от БМКП к нерегистрируемым ВТЛП на основе соматических клеток.

Меркулов Вадим Анатольевич, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России рассказал, где проходит водораздел между ВТЛП и БМКП. Вадим Анатольевич отметил, что 2024 год для национального фармацевтического законодательства РФ является знаковым в плане легитимного закрепления возможности применения медицинскими организациями препаратов на основе жизнеспособных клеток человека, к которым относятся БМКП, произведенных для использования по индивидуальному медицинскому назначению без государственной регистрации. Были рассмотрены постановления, вступившие в силу в 2024 году, и регулирующие производство и применение индивидуальных БМКП. Также были приведены примеры препаратов – исключений для больничного применения в Германии, Испании.

Напомним, что в 2024 году рабочая группа Экспертного совета Евразийской академии надлежащих практик завершила работу по подготовке русскоязычного текста части IV Правил GMP, где представлены требования к производству высокотехнологичных лекарственных препаратов.

На сессии также был представлен опыт российских фармацевтических производителей в части разработки, исследования и производства препаратов крови. Производство препаратов крови – интенсивно развивающееся направление фармацевтической промышленности, которое относится к стратегически значимым государственными задачам в сфере здравоохранения.

Обухов Александр Александрович, директор Медицинского департамента АО «Фармстандарт» выступил с докладом «Взаимосвязь параметров качества, эффективности и безопасности препарата фактора свертывания крови VIII». Александр Александрович рассказал о препаратах факторов крови, производимых на заводе АО «Фармстандарт», подробно остановился на вопросах обеспечения и контроля качества данной группы препаратов. Были приведены результаты исследования эффективности и безопасности препарата фактора свертывания крови VIII в клинической практике. В продолжении доклада Александра Александровича выступил **Нуреев**



Обухов Александр Александрович

Михаил Вадимович, руководитель отдела реализации плазматических проектов АО «Фармстандарт». Михаил Вадимович поделился опытом производства препаратов из плазмы крови на предприятиях группы компаний «Фармстандарт». Докладчик подчеркнул, что лекарственные препараты из плазмы крови человека, такие как альбумин, иммуноглобулин человека нормальный, фактор свертывания крови VIII являются жизненно важными для лечения тяжелых заболеваний.

В завершении сессии выступил **Семенов Иван Александрович**, заместитель генерального директора «Скопинфарм» с докладом «Создание единой системы производства препаратов из плазмы крови на территории РФ от заготовки сырья до готовой лекарственной формы». Для создания в России современного производства полного цикла препаратов из плазмы крови человека компании СКОПИНФАРМ, ФАРМИМЭКС и Октафарма-Фармимэкс заключили специнвестконтракт по созданию в России производства полного цикла препаратов крови, включая получение плазмы для фракционирования по новейшим технологиям, отметил спикер. Создается промышленное производство полного цикла биофармацевтических препаратов, субстанций и препаратов плазмы крови человека, в том числе не имеющих аналогов, производимых на территории РФ с мощностью переработки более 600 тысяч литров плазмы крови в год.

По подсчетам организаторов только на открытии и Пленарном заседании IX Всероссийской GMP-конференции с международным участием присутствовало более 600 участников.



XI РОССИЙСКИЙ ФОРУМ БИОТЕХНОЛОГИЙ

24 - 27 СЕНТЯБРЯ 2024, наукоград КОЛЬЦОВО

БИЗНЕС- ФОРУМ

ДЛЯ БИЗНЕСА,
НАУКИ, ВЛАСТИ
И ИНФРАСТРУКТУРЫ

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ВИРУСОЛОГИЯ,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ,
ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА,
БИОТЕХНОЛОГИЯ, БИОФИЗИКА,
БИОИНФОРМАТИКА

ОТРАСЛЕВАЯ ВЫСТАВКА

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ
КОМПАНИЙ

OPENBIO.RU





Компонентный состав суммарных фракций флавоноидов некоторых видов семейства вересковых и их влияние на NO-стимулирующую активность перитонеальных макрофагов

Я. Е. Решетов¹✉, А. А. Лигачева², Е. С. Трофимова^{1,2}, Н. С. Селиванова^{1,2},
С. В. Кривошеков¹, Е. В. Басова¹, Е. Ю. Шерстобоев², Е. Ю. Авдеева¹,
И. П. Каминский, М. Г. Данилец², М. В. Белоусов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России). 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ). 634009, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5

✉ Контактное лицо: Решетов Ярослав Евгеньевич. E-mail: ferroplex2013@yandex.ru

ORCID: Я. Е. Решетов – <https://orcid.org/0000-0002-9624-8013>;

А. А. Лигачева – <https://orcid.org/0000-0002-3337-1516>;

Е. С. Трофимова – <https://orcid.org/0000-0002-5367-715X>;

Н. С. Селиванова – <https://orcid.org/0009-0006-6218-3051>;

С. В. Кривошеков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>;

Е. В. Басова – <https://orcid.org/0000-0001-7352-0259>;

Е. Ю. Шерстобоев – <https://orcid.org/0000-0002-6178-5329>;

Е. Ю. Авдеева – <https://orcid.org/0000-0001-7061-9843>;

И. П. Каминский – <https://orcid.org/0000-0003-4597-1743>;

М. Г. Данилец – <https://orcid.org/0000-0001-7862-4778>;

М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 03.05.2024

Статья принята в печать: 30.07.2024

Статья опубликована: 01.08.2024

Резюме

Введение. Представители семейства вересковых довольно распространены на территории России и перспективны для создания новых лекарственных средств растительного происхождения. В то же время официальными из них являются только 4 вида. Перспективно исследование биологически активных веществ и фармакологической активности *Andromeda polifolia* L., *Chamaedaphne calyculata* (L.) Moench, *Ledum palustre* L., *Empetrum nigrum* L., обладающих богатыми ресурсными запасами.

Цель. Сравнительное исследование компонентного состава суммарных фракций флавоноидов *A. polifolia*, *C. calyculata*, *L. palustre*, *E. nigrum* и изучение их влияния на NO-стимулирующую активность перитонеальных макрофагов.

Материалы и методы. Измельченную надземную часть (облиственные побеги) предварительно депигментировали хлороформом, обрабатывали 70%-м водным ацетоном, ацетон удаляли. Флавоноиды экстрагировали этилацетатом из водной фазы. Идентификацию флавоноидов проводили методом ВЭЖХ (хроматограф UltiMate 3000) по совпадению времен удерживания и спектральных характеристик, расчет содержания – методом простой нормировки. Влияние образцов на продукцию оксида азота изучали на макрофагах мышей линии C57BL/6. Контроль эндотоксина в образцах осуществляли с помощью ЛАЛ-теста и инкубирования клеток в присутствии полимиксина В.

Результаты и обсуждение. Исследован компонентный состав фракций флавоноидов *A. polifolia*, *C. calyculata*, *L. palustre*, *E. nigrum*. В побегах *C. calyculata* обнаружены 8 фенольных соединений, в том числе изокверцитрин, гербацетин, нарингенин и нарингин – впервые для данного вида. В побегах *A. polifolia* выявлено 5 соединений, в том числе изокверцитрин и гербацетин – впервые для данного вида. В побегах *L. palustre* и *E. nigrum* идентифицированы 5 и 4 соединения соответственно, при этом во всех образцах преобладающими являются гликозиды кверцетина: изокверцитрин, гиперозид и рутин. Суммарная фракция флавоноидов *C. calyculata* в дозах 1, 5, 10 мкг/мл ингибирует продукцию оксида азота макрофагами на 30 %, а флавоноиды *E. nigrum* в дозах 100 и 200 мкг/мл, напротив, усиливают продукцию нитритов макрофагами на 33 и 37 % соответственно.

© Решетов Я. Е., Лигачева А. А., Трофимова Е. С., Селиванова Н. С., Кривошеков С. В., Басова Е. В., Шерстобоев Е. Ю., Авдеева Е. Ю., Каминский И. П., Данилец М. Г., Белоусов М. В., 2024

© Reshetov Ya. E., Ligacheva A. A., Trofimova E. S., Selivanova N. S., Krivoshechikov S. V., Basova E. V., Sherstoboev E. Yu., Avdeeva E. Yu., Kaminsky I. P., Danilets M. G., Belousov M. V., 2024

Заключение. Проведено сравнительное исследование компонентного состава суммарных фракций флавоноидов *A. polifolia*, *C. calyculata*, *L. palustre*, *E. nigrum*, которые способны активировать как M1-, так и M2-поляризацию перитонеальных макрофагов мышей, что требует дальнейшего углубленного изучения. Перспективными для дальнейшего изучения являются флавоноиды *C. calyculata* и *E. nigrum*.

Ключевые слова: *Andromeda polifolia* L., *Chamaedaphne calyculata* (L.) Moench, *Ledum palustre* L., *Empetrum nigrum* L., флавоноиды, макрофаги, оксид азота

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

Вклад авторов. Я. Е. Решетов, Е. Ю. Шерстобоев, М. Г. Данилец, М. В. Белоусов планировали и разрабатывали эксперименты. Я. Е. Решетов, Е. Ю. Авдеева, Е. В. Басова выделяли суммарные фракции флавоноидов. С. В. Кривошеков, Я. Е. Решетов, И. П. Каминский проводили исследование методом ВЭЖХ. А. А. Лигачева, Е. С. Трофимова, Н. С. Селиванова осуществляли биологические эксперименты. Все авторы участвовали в написании текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-01035.

Соответствие принципам этики. Эксперименты с использованием лабораторных животных выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, и были одобрены биоэтическим комитетом НИИФирм им. Е. Д. Гольдберга, протокол № 227012024 от 01.02.2024 г.

Для цитирования: Решетов Я. Е., Лигачева А. А., Трофимова Е. С., Селиванова Н. С., Кривошеков С. В., Басова Е. В., Шерстобоев Е. Ю., Авдеева Е. Ю., Каминский И. П., Данилец М. Г., Белоусов М. В. Компонентный состав суммарных фракций флавоноидов некоторых видов семейства вересковых и их влияние на NO-стимулирующую активность перитонеальных макрофагов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):39–51. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1813>

The component composition of the total flavonoid fractions from some *Ericaceae* family and their effect on the NO-stimulating activity of peritoneal macrophages

Yaroslav E. Reshetov¹✉, Anastasia A. Ligacheva², Evgenia S. Trofimova^{1,2},
Natalia S. Selivanova^{1,2}, Sergey V. Krivoshchekov¹, Elena V. Basova¹,
Evgeniy Yu. Sherstoboev², Elena Yu. Avdeeva¹, Ilya P. Kaminsky, Marina G. Danilets²,
Mikhail V. Belousov¹

¹ Siberian State Medical University, SSMU. 2, Moskovskij trakt, Tomsk, 634050, Russia

² Federal State Budgetary Scientific Institution "Tomsk National Research Center for Medicine by the Russian Academy of Sciences". 5, Cooperative lane, Tomsk, 634009, Russia

✉ **Corresponding author:** Yaroslav E. Reshetov. **E-mail:** ferroplex2013@yandex.ru

ORCID: Yaroslav E. Reshetov – <https://orcid.org/0000-0002-9624-8013>;
Anastasia A. Ligacheva – <https://orcid.org/0000-0002-3337-1516>;
Evgenia S. Trofimova – <https://orcid.org/0000-0002-5367-715X>;
Natalia S. Selivanova – <https://orcid.org/0009-0006-6218-3051>;
Sergey V. Krivoshchekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>;
Elena V. Basova – <https://orcid.org/0000-0001-7352-0259>;
Evgeniy Yu. Sherstoboev – <https://orcid.org/0000-0002-6178-5329>;
Elena Yu. Avdeeva – <https://orcid.org/0000-0001-7061-9843>;
Ilya P. Kaminsky – <https://orcid.org/0000-0003-4597-1743>;
Marina G. Danilets – <https://orcid.org/0000-0001-7862-4778>;
Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 03.05.2024

Accepted: 30.07.2024

Published: 01.08.2024

Abstract

Introduction. Representatives of the *Ericaceae* family are quite common in Russia and are promising for the creation of new medicines of plant origin. At the same time, only 4 of them are official. The study of biologically active substances and pharmacological activity of *Andromeda polifolia* L., *Chamaedaphne calyculata* (L.) Moench, *Ledum palustre* L., *Empetrum nigrum* L. with rich resource reserves is promising.

Aim. Comparative study of the composition of total flavonoid fractions from *A. polifolia*, *C. calyculata*, *L. palustre*, *E. nigrum* and study of their effect on the NO-stimulating activity of peritoneal macrophages

Materials and methods. The crushed aboveground part (leafy shoots) was previously depigmented with chloroform, treated with 70 % aqueous acetone, then acetone was removed. Flavonoids were extracted with ethyl acetate from the aqueous phase. The identification of flavonoids was carried out by HPLC (UltiMate 3000 chromatograph) according to the coincidence

of retention times and spectral characteristics, the calculation of the content was carried out by simple normalization. The effect of the samples on nitric oxide production was studied on macrophages of C57BL/6 mice. Endotoxin control in the samples was carried out using a LAL test and cell incubation in the presence of polymyxin B.

Results and discussion. The composition of flavonoid fractions from *A. polifolia*, *C. calyculata*, *L. palustre* and *E. nigrum* has been studied. 8 phenolic compounds were found in *C. calyculata* shoots, including isoquercitrin, herbacetin, naringenin and naringin – for the first time for this species. 5 compounds were detected in *A. polifolia* shoots, including isoquercitrin and herbacetin, for the first time for this species. 5 and 4 compounds were identified in *L. palustre* and *E. nigrum* shoots, respectively, while quercetin glycosides are predominant in all samples: isoquercitrin, hyperoside and rutin. The fraction of *C. calyculata* flavonoids at doses of 1, 5, 10 mcg/ml inhibits the production of nitric oxide by macrophages by 30 %, and *E. nigrum* flavonoids at doses of 100 and 200 mcg/ml, on the contrary, enhance the production of nitrites by macrophages by 33 and 37 %, respectively.

Conclusion. A comparative study of the composition of total flavonoid fractions from *A. polifolia*, *C. calyculata*, *L. palustre*, and *E. nigrum*, which are capable of activating both M1 and M2 polarization of peritoneal macrophages in mice, has been conducted, which requires further in-depth study. The flavonoids *C. calyculata* and *E. nigrum* are promising for further study.

Keywords: *Andromeda polifolia* L., *Chamaedaphne calyculata* (L.) Moench, *Ledum palustre* L., *Empetrum nigrum* L., flavonoids, macrophages, nitric oxide

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. Yaroslav E. Reshetov, Evgeniy Yu. Sherstoboev, Marina G. Danilets, Mikhail V. Belousov planned and developed experiments. Yaroslav E. Reshetov, Elena Yu. Avdeeva, Elena V. Basova isolated the total fractions of flavonoids. Sergey V. Krivoshchekov, Yaroslav E. Reshetov, Ilya P. Kaminsky conducted a study by HPLC. Anastasia A. Ligacheva, Evgenia S. Trofimova, Natalia S. Selivanova carried out biological experiments. All the authors participated in writing the text of the article.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-75-01035.

Compliance with the principles of ethics. Experiments using laboratory animals were carried out in compliance with the principles of humaneness set out in the European Community Directives (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki, and were approved by the bioethical committee of the NII FIRM named after E. D. Goldberg, protocol No. 227012024 dated 01.02.2024.

For citation: Reshetov Ya. E., Ligacheva A. A., Trofimova E. S., Selivanova N. S., Krivoshchekov S. V., Basova E. V., Sherstoboev E. Yu., Avdeeva E. Yu., Kaminsky I. P., Danilets M. G., Belousov M. V. The component composition of the total flavonoid fractions from some *Ericaceae* family and their effect on the NO-stimulating activity of peritoneal macrophages. *Drug development & registration*. 2024;13(3):39–51. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1813>

ВВЕДЕНИЕ

Растения семейства вересковых (*Ericaceae*) имеют обширный ареал распространения [1], при этом некоторые регионы Сибири могут служить местами массовой заготовки некоторых видов [2]. Несмотря на достаточно хорошую изученность химического состава и широкое применение в народной медицине, многие виды вересковых не относятся к официальным. Так, в Государственную фармакопею РФ XV издания входят лишь 4 вида: *Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L., *Arctostaphylos uva-ursi* L. Spreng. и *Ledum palustre* L. [3]. Известно, что многие неофициальные виды вересковых имеют богатый химический состав, представленный различными классами соединений, в частности терпенами (сескви-, три-,

ди-, монотерпенами), фенольными соединениями (дубильные вещества смешанной группы, фенологликозиды, флавоноиды, кумарины, гидроксикоричные кислоты), полисахаридами, аминокислотами, макро- и микроэлементами, и обладают противовоспалительной, противовирусной, антиоксидантной, акваретической, уроантисептической, антимикробной и противогрибковой активностью [4–6].

Ряд представителей семейства вересковых отличаются разнообразным составом и высоким содержанием флавоноидов, благодаря чему проявляют иммуномодулирующую, антибактериальную, противовирусную, противовоспалительную, противоопухолевую и другие виды активности [4, 7–9]. При этом стоит отметить, что состав флавоноидов *Andromeda polifolia* L., *Chamaedaphne calyculata* (L.) Moench, *Le-*

dum palustre L., *Empetrum nigrum* L. и их биологическая активность мало исследованы или не изучены совсем.

Таким образом, благодаря богатым ресурсным запасам указанные виды являются перспективным источником биологически активных веществ, в том числе и флавоноидов, а исследование их фармакологической активности является актуальным научным направлением.

Цель работы. Сравнительное исследование компонентного состава суммарных фракций флавоноидов *Andromeda polifolia* L., *Chamaedaphne calyculata* (L.) Moench, *Ledum palustre* L., *Empetrum nigrum* L. и изучение их влияния на NO-стимулирующую активность перитонеальных макрофагов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

В качестве объектов исследования были использованы надземные части (облиственные побеги) *Andromeda polifolia* L., *Chamaedaphne calyculata* (L.) Moench, *Ledum palustre* L., *Empetrum nigrum* L., заготовленные в 2023 году в Томской области, Республике Алтай и высушенные воздушно-теневым способом до содержания влаги 5–7 %. С учетом литературных сведений о максимальном накоплении биологически активных веществ в растениях семейства вересковых [4, 5, 10, 11] сырье было заготовлено в фазу плодоношения.

Выделение суммарных фракций флавоноидов

Навески воздушно-сухого сырья массой 120,0 г измельчали до размера частиц 1–3 мм и исчерпывающе экстрагировали хлороформом для депигментации сырья. Депигментированное сырье трижды экстрагировали 70%-м водным ацетоном в соотношении 1:8 при температуре 25 °С в течение 1 часа при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Полученные порции экстрактов объединяли, фильтровали через бумажный фильтр на воронке Бюхнера и переносили в делительную воронку. Экстракт насыщали кристаллическим натрия хлоридом (х. ч.), нижнюю (водную) фазу отделяли, верхнюю (ацетоновую) фазу промывали (3 × 100 мл) насыщенным раствором натрия хлорида, промывные воды присоединяли к водному раствору, из которого удаляли остатки ацетона под вакуумом при температуре 25 °С. Водный раствор обрабатывали этилацетатом (4 × 200 мл), полученные порции объединяли и этилацетат удаляли под вакуумом при температуре 25 °С до сухого остатка. Схема выделения представлена на рисунке 1.

Исследование компонентного состава суммарных фракций флавоноидов

Компонентный состав суммарных фракций флавоноидов определяли на жидкостном хроматографе UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенном диодно-матричным детектором. Разделение проводили на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 150 мм, 3,5 мкм, в режиме градиентного элюирования: 0–3 мин – 10 % В; 3–20 мин – 10–50 % В; 20–25 мин – 50–100 % В; 25–30 мин – 100 % В; 30–40 мин – 10 % В; в качестве подвижной фазы использовали 0,2 % раствор муравьиной кислоты в воде Type I (Pharmel diatomic, Россия) – элюент А; ацетонитрил для хроматографии (ООО «НПК Криохром», Россия). Объем вводимой пробы – 5 мкл. Регистрацию хроматограмм проводили в диапазоне 190–300 нм, в качестве аналитической длины волны выбрана величина 260 нм.

Идентификацию веществ проводили по совпадению времен удерживания и спектральных характеристик со стандартными образцами (концентрация 1 мг/мл), расчет содержания – методом простой нормировки. В качестве стандартов использовали следующие образцы: кверцетин (CAS № 117-39-5), кемпферол (CAS № 520-18-3), лютеолин (CAS № 491-70-3), нарингенин (CAS № 480-41-1), мирицетин (CAS № 529-44-2), гербацетин (CAS № 527-95-7), дигидромирицетин (CAS № 215254-15-1), дигидрокемпферол, рутин (CAS № 153-18-4), изокверцитрин (CAS № 21637-25-2), гиперозид (CAS № 482-36-0), авикулярин (CAS № 572-30-5), лютеолин-7-глюкозид (CAS № 5373-11-5), нарингин (CAS N.10236-47-2), хлорогеновая кислота (CAS № 1049703-62-9), галловая кислота (CAS № 149-91-7) (Acros Organics BVBA, Бельгия; Merck KGaA, Германия).

Изучение пролиферации и NO-стимулирующих свойств флавоноидов

Макрофаги (МФ) получали из перитонеальной полости мышей линии C57BL/6 (возраст 8–10 недель), выращенных в отделе экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ, используя набор для селекции клеток EasySep™ Biotin Positive Selection Kit и антитела специфические к макрофагальным рецепторам Anti-Mouse F4/80 Antibody (Stem Cell, США).

Навеску каждой исследуемой фракции флавоноидов весом не менее 3 мг растворяли непосредственно перед использованием в эксперименте в расчетном количестве культуральной среды RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 1,5 мг/мл. Далее из этого раствора готовили трехкратный раствор нужной концентрации (1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 мкг/мл), 50 мкл которого вносили в лунку, добав-

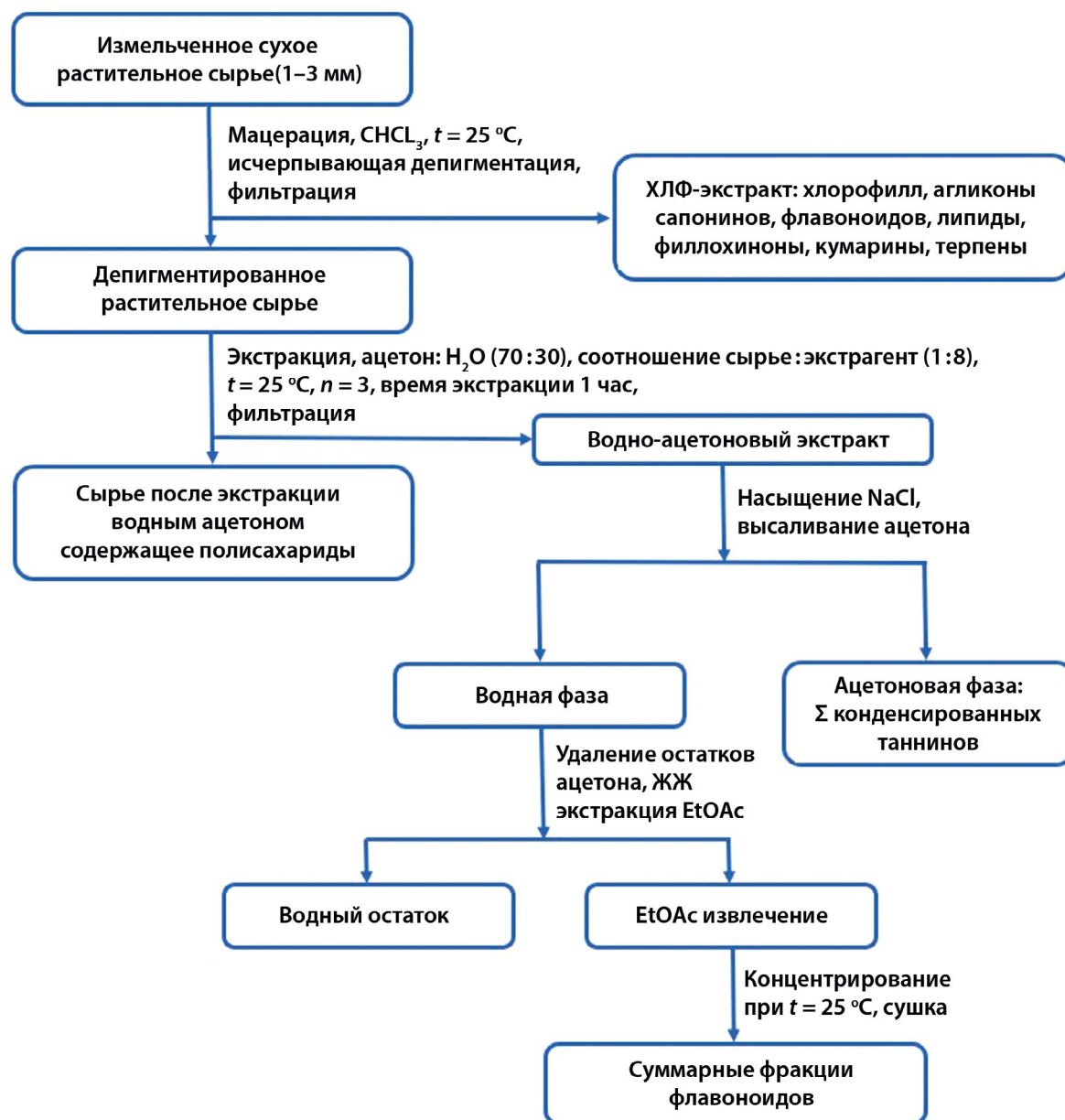


Рисунок 1. Схема выделения суммарных фракций флавоноидов

ляли по 100 мкл макрофагов из расчета 400 тыс/лунка. Каждый образец исследовали в пяти повторностях.

Клетки культивировали при 37 °C в атмосфере с 5%-м CO₂ и абсолютной влажности в среде следующего состава: RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10%-й ЭТС (Hyclone Uk Ltd., Великобритания), 20 мМ HEPES (Sigma-Aldrich, США), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США), 50 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) и 2 мМ L-глутамина (Sigma-Aldrich, США).

НО-синтазную активность зрелых перитонеальных МФ оценивали по концентрации нитритов в супернатанте клеток после 48-часового культивирования в присутствии изучаемых образцов или липопо-

лисахарида (ЛПС) (серотип O111:B4, Sigma-Aldrich, США), добавляя к нему реактив Грисса (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1:1. Оптическую плотность растворов измеряли на многоканальном спектрофотометре Titertek Multiskan® MCC (Labsystems, Финляндия), длина волны 540 нм.

Присутствие эндотоксина и его влияние на результаты эксперимента оценивали двумя методами:

- 1) с использованием ЛАЛ-реактива PYROSTAR™ ES-F 0.03 ЕЗ/мл (FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Германия);
- 2) с добавлением антибиотика полимиксина В (50 мкг/мл, InvivoGen, США) к исследуемым веществам, с последующим инкубированием клеток, как описано выше.

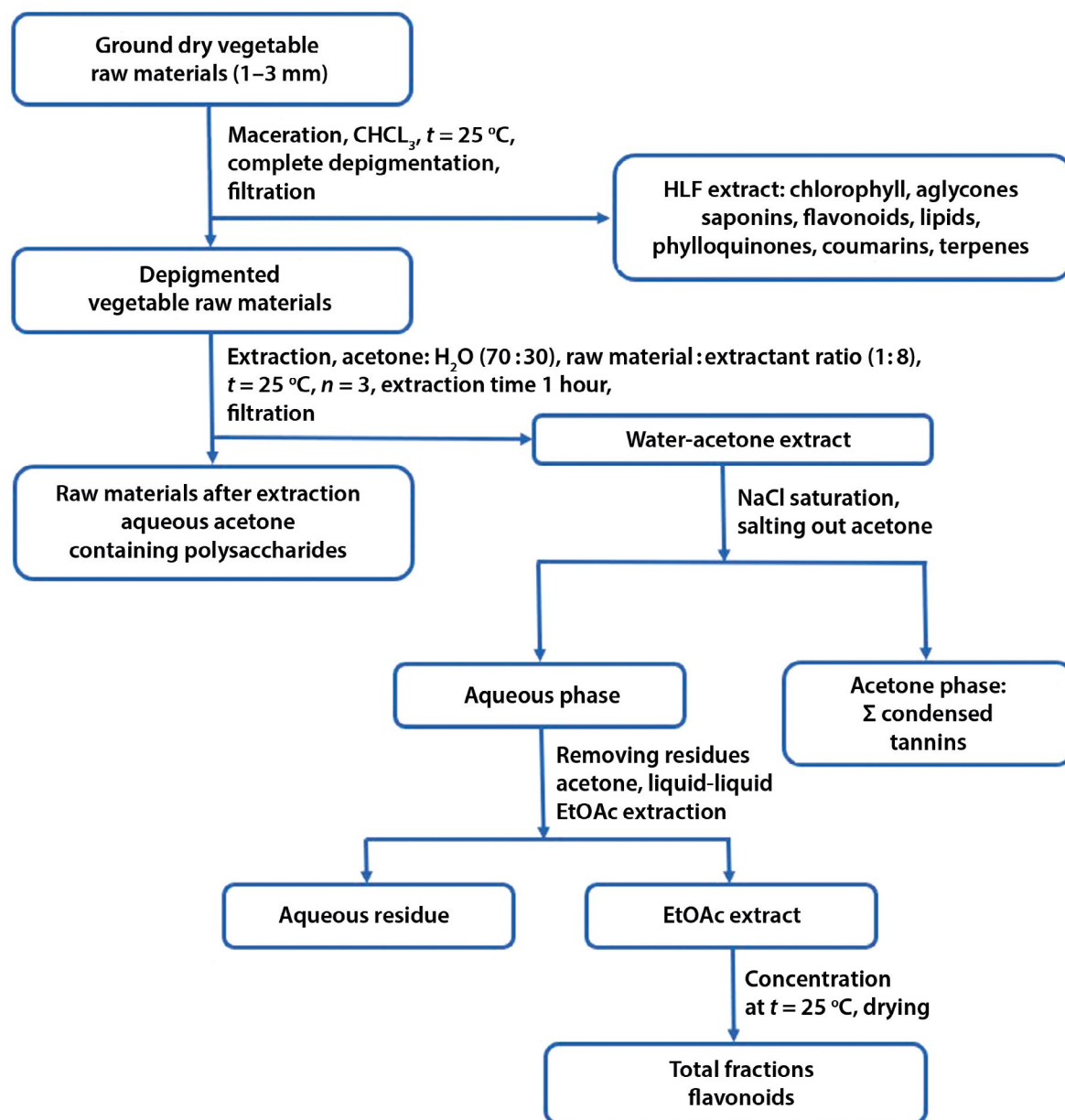


Figure 1. Scheme for obtaining total flavonoid fractions

Цитотоксические свойства изучаемых веществ определяли в классическом тесте МТТ в лизате МФ, добавляя за 4 часа до окончания инкубации бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ, Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 200 мкг/мл, затем осадок растворяли диметилсульфоксидом (Sigma-Aldrich, США) и измеряли оптическую плотность (ед. опт. плотности), как описано выше.

Статистическая обработка

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ STATISTICA 13.3, используя критерий Шапиро – Уилка для проверки нормальности распределе-

ния, однофакторный дисперсионный анализ и критерий Даннета. Результаты представлены в виде

$$\bar{X} \pm m,$$

где $\bar{X}$ – среднее значение; m – стандартная ошибка среднего. Уровень значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из облиственных побегов *A. polifolia*, *C. calyculata*, *L. palustre*, *E. nigrum* получены фракции флавоноидов, выход которых определен гравиметрически и составил 0,83; 1,83; 1,14 и 2,36 % в пересчете на абсолютно сухое исходное сырье соответственно. Анализ фракций показал содержание порядка 5–

8 компонентов флавоноидной природы в исследуемых видах (рисунок 2). При этом в составе фракций обнаружены преимущественно гликозиды кверцетина, что говорит о селективности выбранного метода экстракции.

Исследуемые суммарные фракции флавоноидов отличаются как по качественному составу, так и по количественному содержанию (таблица 1). Так, сумма флавоноидов *C. calyculata* представлена 8 фенольными соединениями: изокверцитрином, гиперозидом, рутином, гербацетином, нарингенином со следовыми количествами фенолкарбоновых кислот: галловой, хлорогеновой – и флавононого гликозида – нарингина. Сумма флавоноидов *A. polifolia* со-

держит 5 фенольных соединений: изокверцитрин, гиперозид, рутин, гербацетин и следы хлорогеновой кислоты. В исследуемом образце *L. palustre* обнаружены 5 флавоноидных гликозидов: изокверцитрин, гиперозид, рутин, авикулярин и лютеолин-7-глюкозид (цинарозид), а в *E. nigrum* – изокверцитрин, гиперозид, рутин и кверцетин.

Мажорными компонентами всех фракций являются изокверцитрин, гиперозид и рутин, однако содержание их существенно варьируется. Так, в этилацетатной фракции *C. calyculata* обнаружен изокверцитрин в количестве $30,01 \pm 0,57\%$, гиперозид – $16,02 \pm 0,99\%$, рутин – $1,82 \pm 0,70\%$; во фракции *A. polifolia* определен изокверцитрин – $46,31 \pm$

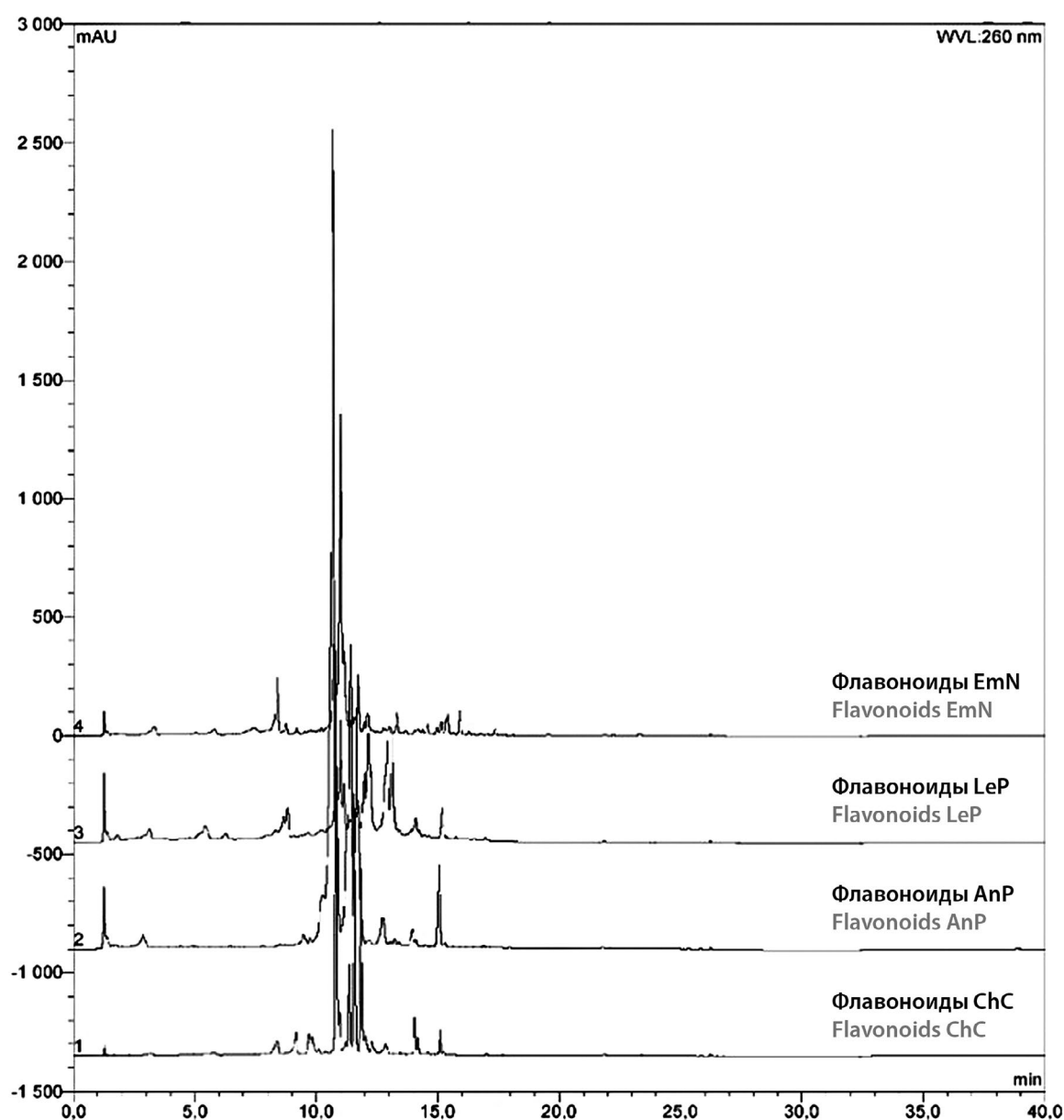


Рисунок 2. Хроматограммы фракций флавоноидов *C. calyculata* (1), *A. polifolia* (2), *L. palustre* (3), *E. nigrum* (4)

Figure 2. Chromatograms of flavonoid fractions from *C. calyculata* (1), *A. polifolia* (2), *L. palustre* (3), *E. nigrum* (4)

Таблица 1. Содержание флавоноидов во фракциях *C. calyculata* (ChC), *A. polifolia* (AnP), *L. palustre* (LeP), *E. nigrum* (EmN)

Table 1. Flavonoid content in fractions of *C. calyculata* (ChC), *A. polifolia* (AnP), *L. palustre* (LeP), *E. nigrum* (EmN)

№	Стандартное вещество Standard substance	tR стандарта, мин tR of the standard, min	ChC		AnP		LeP		EmN	
			tR, min	W, %	tR, min	W, %	tR, min	W, %	tR, min	W, %
1	Кверцетин Quercetin	17,37	–		–		–		17,39	0,49 ± 0,01
2	Кемпферол Kaempferol	10,53	–		–		–		–	
3	Рутин Routine	10,91	10,95	1,82 ± 0,70	10,85	5,76 ± 0,22	11,02	4,02 ± 0,20	11,15	8,33 ± 0,99
4	Изокверцитрин Isoquercitrin	10,87	10,81	30,01 ± 0,57	10,69	46,31 ± 0,84	10,88	15,22 ± 0,99	11,00	39,04 ± 0,86
5	Гиперозид Hyperoside	11,87	11,85	16,02 ± 0,99	11,69	13,45 ± 0,99	11,84	6,17 ± 0,01	11,99	0,85 ± 0,05
6	Авикулярин Avicularin	8,48	–		–		8,89	6,60 ± 0,29	–	
7	Дигидромирицетин Dihydromyricetin	2,01	–		–		–		–	
8	Галловая кислота Gallic acid	13,19	13,46	0,10 ± 0,02	–		–		–	
9	Мирицетин Myricetin	13,90	–		–		–		–	
10	Гербацетин Herbacetin	11,17	11,36	6,98 ± 0,39	11,42	12,75 ± 0,18	–		–	
11	Лютеолин-7-гликозид Luteolin-7-glycoside	5,95	–		–		5,62	2,63 ± 0,06	–	
12	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid	15,11	15,24	0,24 ± 0,10	15,29	0,15 ± 0,06	–		–	
13	Лютеолин Luteolin	16,81	–		–		–		–	
14	Нарингенин Naringenin	12,20	12,29	0,91 ± 0,01	–		–		–	
15	Нарингин Naringin	13,21	13,58	0,05 ± 0,01	–		–		–	
16	Дигидрокемпферол Dihydrocampferol	13,38	–		–		–		–	

Примечание. «–» – не определено.

Note. "–" – not defined.

0,84 %, гиперозид – 13,45 ± 0,99 %, рутин – 5,76 ± 0,22 %. Содержание вышеуказанных флавоноидов во фракции *L. palustre* составило 15,22 ± 0,99 %, 6,17 ± 0,01 % и 4,02 ± 0,20 %, *E. nigrum* – 39,04 ± 0,86 %, 0,85 ± 0,05 % и 8,33 ± 0,99 % соответственно. Следует отметить, что изокверцитрин и гербацетин были обнару-

жены впервые для *C. calyculata* и *A. polifolia*, нарингенин и нарингин – впервые для *C. calyculata*. Эти данные позволяют существенно расширить спектр изучения фармакологических свойств экстрактов данных растений, поскольку гербацетин и нарингенин обладают потенциальным противовирусным

действием в отношении вирусов SARS-CoV и MERS-CoV в сочетании с противовоспалительной и противоопухолевой активностью [12–14].

Ряд компонентов не был идентифицирован в исследуемых растениях, в частности, не обнаружены дигидромирицетин, дигидрокемпферол, мирицетин, лютеолин и кемпферол. Кверцетин, присутствующий, по литературным данным, в некоторых исследуемых видах [15, 16], мог быть удален из сырья при предварительной экстракции хлороформом.

Несмотря на то, что состав фенольных компонентов *C. calyculata*, *A. polifolia*, *L. palustre*, *E. nigrum* малоизучен, надо отметить, что в некоторых видах семейства вересковых также были идентифицированы кверцетин [8, 17], изокверцитрин [8], хлорогеновая кислота [17], галловая кислота [8] и ее производные [18]. Кроме того, в видах *Vaccinium* обнаружены ряд антоцианов, астрагалин, коричная, сиригинговая, феруловая и кофейная кислоты [8]. При этом в листьях черники кофеилхиновые кислоты составили порядка 80 % от общего содержания фенолов [19].

Кроме того, известно о наличии кверцетина, рутина, гиперозида в некоторых видах рододендрона [20–22].

При проведении контроля наличия эндотоксина при помощи ЛАЛ-теста во всех исследуемых образцах фракций флавоноидов величина бактериальных эндотоксинов (БЭ) составила менее 0,96 ЕЭ/мл (менее 0,048 ЕЭ/мкг), что свидетельствует о незначительном количестве эндотоксинов.

В результате изучения пролиферации и NO-стимулирующих свойств флавоноидов, выделенных из изучаемых растений, на модели перитонеальных макрофагов (МФ) мышей выявили, что фракции, выделенные из *A. polifolia* и *L. Palustre*, не влияли на NO-стимулирующие свойства МФ (таблица 2), фракции *C. calyculata* в дозах 1, 5, 10 мкг/мл ингибировали продукцию нитритов на 30 %, а *E. nigrum*, напротив, в дозировке 100 и 200 мкг/мл усиливали продукцию нитритов на 33 и 37 % соответственно. ЛПС усиливал продукцию NO макрофагами в 6,5–16,6 раз в разных сериях экспериментов.

Таблица 2. Влияние фракций флавоноидов *C. calyculata* (ChC), *A. polifolia* (AnP), *L. palustre* (LeP), *E. nigrum* (EmN) на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57BL/6, $X \pm m$

Table 2. Effect of flavonoid fractions from *C. calyculata* (ChC), *A. polifolia* (AnP), *L. palustre* (LeP), *E. nigrum* (EmN) on nitric oxide production by peritoneal macrophages of intact C57BL/6, $X \pm m$ mice

Вещество Substance	Концентрация, мкг/мл Concentration, mcg/ml	Концентрация нитритов, мкм The concentration of nitrites, mkmol	Пролиферация, ед. оп. плотности, 10^{-3} Proliferation, units of opt. density, 10^{-3}
Среда (контроль1) Medium (control 1)	–	$5,35 \pm 0,14$	639 ± 7
ЛПС (контроль 2) LPS (control 2)	0,1	$23,62 \pm 0,93^*$	605 ± 11
ChC	1	$4,20 \pm 0,15^{**}$	600 ± 5
	5	$3,99 \pm 0,16^{**}$	586 ± 7
	10	$4,22 \pm 0,17^{**}$	584 ± 8
	20	$4,82 \pm 0,13^*$	604 ± 13
	50	$4,61 \pm 0,14^*$	564 ± 15
	100	$4,69 \pm 0,13^*$	590 ± 9
	200	$4,87 \pm 0,12^*$	$336 \pm 8^{**}$
	500	n/p n/r	$203 \pm 6^{**}$
Среда (контроль1) Medium (control 1)	–	$3,14 \pm 0,12$	624 ± 9
ЛПС (контроль 2) LPS (control 2)	0,1	$40,14 \pm 0,25^*$	581 ± 7
AnP	1	$3,44 \pm 0,08^*$	650 ± 8
	5	$3,08 \pm 0,11^*$	$680 \pm 6^*$
	10	$2,88 \pm 0,10^*$	626 ± 8
	20	$3,04 \pm 0,10^*$	599 ± 12
	50	$2,91 \pm 0,10^*$	$324 \pm 13^{**}$
	100	$3,13 \pm 0,11^*$	$190 \pm 5^{**}$
	200	$3,42 \pm 0,11^*$	$201 \pm 6^{**}$
	500	n/p n/r	$161 \pm 4^{**}$

Вещество Substance	Концентрация, мкг/мл Concentration, mcg/ml	Концентрация нитритов, мкМ The concentration of nitrites, mkmol	Пролиферация, ед. опт. плотности, 10 ⁻³ Proliferation, units of opt. density, 10 ⁻³
Среда (контроль 1) Medium (control 1)	–	3,91 ± 0,12	687 ± 8
ЛПС (контроль 2) LPS (control 2)	0,1	62,12 ± 0,60*	659 ± 9
LeP	1	3,40 ± 0,17•	613 ± 11
	5	3,49 ± 0,12•	643 ± 12
	10	3,47 ± 0,13•	657 ± 9
	20	3,83 ± 0,07•	666 ± 10
	50	3,56 ± 0,09•	493 ± 8**
	100	3,52 ± 0,16•	190 ± 4**
	200	4,06 ± 0,18•	183 ± 4**
	500	н/р n/r	140 ± 3**
Среда (контроль 1) Medium (control 1)	–	3,55 ± 0,10	647 ± 5
ЛПС (контроль 2) LPS (control 2)	0,1	58,83 ± 0,56*	557 ± 4
EmN	1	3,58 ± 0,13•	645 ± 8
	5	3,16 ± 0,09•	568 ± 13
	10	3,67 ± 0,13•	611 ± 10
	20	3,89 ± 0,15•	629 ± 8
	50	4,06 ± 0,17•	644 ± 9
	100	4,73 ± 0,12**	588 ± 11
	200	4,87 ± 0,22**	256 ± 9**
	500	н/р n/r	183 ± 3**

Примечание. * – различия показателя с контролем 1 достоверны; • – различия показателя по сравнению с контролем 2; н/р – нераспознаваемые значения; $p < 0,05$, $n = 5$. ЛПС – липополисахарид.

Note. * – differences in the indicator with control 1 are significant; • – differences in the indicator compared with control 2; n/r – not recognizable values; $p < 0.05$, $n = 5$. LPS – lipopolysaccharide.

Суммарные фракции флавоноидов, выделенные из *C. calyculata* и *E. nigrum*, в МТТ-тесте в дозах 200 и 500 мкг/мл проявили значительное дозозависимое цитотоксическое действие, снижая оптическую плотность соответственно на 48 и 68 % (*C. calyculata*), 61 и 72 % (*E. nigrum*). Культивирование МФ с фракциями флавоноидов, выделенными из *A. polifolia* и *L. palustre*, выявило снижение пролиферации клеток уже начиная с концентрации образцов 50 мкг/мл (на 49 % *A. polifolia* и 29 % *L. palustre*) и далее в дозах 100 мкг/мл (на 70 % *A. polifolia* и 73 % *L. palustre*), 200 мкг/мл (на 70 % *A. polifolia* и 73 % *L. palustre*) и 500 мкг/мл (на 75 % *A. polifolia* и 80 % *L. palustre*).

С целью оценки влияния эндотоксина на результаты экспериментов МФ культивировали с фракциями флавоноидов изучаемых растений в присутствии полимиксина Б. Пирогенных примесей ни в одном из исследуемых образцов не выявили (таблица 3). Более того, при культивировании клеток в присутст-

вии фракции флавоноидов *C. calyculata* после обработки антибиотиком происходило усиление продукции нитритов в 1,5 раза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован компонентный состав суммарных фракций флавоноидов *Andromeda polifolia* L., *Chamaedaphne calyculata* (L.) Moench, *Ledum palustre* L., *Empetrum nigrum* L. Установлено, что доминирующими компонентами во всех исследуемых образцах являются гликозиды кверцетина: изокверцитрин, гиперозид и рутин. Впервые для видов *A. polifolia*, *C. calyculata* обнаружены гербацетин и изокверцитрин, для *C. calyculata* – флаванон нарингенин и его гликозид – нарингин.

Впервые проведено эндотоксиннезависимое исследование влияния суммарных фракций флавоноидов исследуемых видов на NO-стимулирующую ак-

Таблица 3. Влияние фракций флавоноидов *C. calyculata* (ChC), *A. polifolia* (AnP), *L. palustre* (LeP), *E. nigrum* (EmN) на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов интактных мышей линии C57BL/6 в отсутствие и в присутствии полимиксина Б ($X \pm m$)

Table 3. Effect of flavonoid fractions from *C. calyculata* (ChC), *A. polifolia* (AnP), *L. palustre* (LeP), *E. nigrum* (EmN) on the activity of NO synthase of peritoneal macrophages of intact C57BL/6 mice in the absence and presence of polymyxin B ($X \pm m$)

Вещество Substance	Концентрация, мкг/мл Concentration, mcg/ml	Концентрация нитритов, мкМ The concentration of nitrites, mkmol	
		инкубация без полимиксина Б incubation without polymyxin B	инкубация с полимиксином Б incubation with polymyxin B
Среда (контроль 1) Medium (control 1)	–	2,54 ± 0,07	2,35 ± 0,10
ЛПС (контроль 2) LPS (control 2)	0,1	41,78 ± 0,39*	3,66 ± 0,08▲■
ChC	50	2,29 ± 0,14*	3,48 ± 0,20▲■
Среда (контроль 1) Medium (control 1)	–	3,16 ± 0,14	3,22 ± 0,14
ЛПС (контроль 2) LPS (control 2)	0,1	60,28 ± 0,56*	4,28 ± 0,13▲■
AnP	20	3,67 ± 0,09*	3,68 ± 0,19
LeP	20	3,30 ± 0,12*	3,39 ± 0,09
EmN	100	3,95 ± 0,13*•	4,84 ± 0,12▲■

Примечание. * – различия показателя со средой без полимиксина достоверны; • – различия показателя по сравнению с ЛПС (без полимиксина) достоверны; ▲ – различия показателя с инкубацией каждого вещества без полимиксина; ■ – различия показателя со средой с полимиксином достоверны; $p < 0,05$, $n = 5$. ЛПС – липополисахарид.

Note. * – differences in the indicator with a medium without polymyxin are significant; • – differences in the indicator compared to LPS (without polymyxin) are significant; ▲ – differences in the indicator with incubation of each substance without polymyxin; ■ – differences in the indicator with a medium with polymyxin are significant; $p < 0.05$, $n = 5$. LPS – lipopolysaccharide.

тивность перитонеальных макрофагов. Результаты проведенных исследований показали, что флавоноиды *C. calyculata* и *E. nigrum*, не обладая цитотоксическими свойствами в дозах до 100 мкг/мл включительно, проявляют диаметрально различное влияние на продукцию нитритов макрофагами. Флавоноиды *C. calyculata* ингибируют секретирующие свойства клеток, а *E. nigrum*, напротив, стимулируют. Флавоноиды *A. polifolia* и *L. palustre* не влияли на продукцию нитритов, но спектр их нетоксичных концентраций ограничивался 20 мкг/мл. Полученные данные позволяют предположить, что изученные суммы флавоноидов, выделенные из разных растений семейства вересковых, способны активировать как М1-, так и М2-поляризацию перитонеальных макрофагов мышей, что требует дальнейшего углубленного изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тахтаджян А. Л., Федоров А. А., Буданцев Л. Ю. и др., ред. Жизнь растений. Т. 5. Ч. 2. Цветковые растения. М.: Просвещение; 1981. 511 с.
2. Березовская Т. П., ред. Некоторые вопросы фармакогнозии дикорастущих и культивируемых растений Сибири. Томск: Изд-во Томского Университета; 1969. 229 с.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. М.: Министра здравоохранения Российской Федерации; 2023.
4. Белоусов М. В. Фармакогностическая характеристика и биологическая активность представителей семейства вересковые (Ericaceae) флоры Сибири и Дальнего Востока. Дис. ... докт. фарм. наук. Томск; 2004. 310 с. Доступно по: <https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskaya-kharakteristika-i-biologicheskaya-aktivnost-predstavitelei-semeistva-v>. Ссылка активна на 03.05.2024.
5. Фурса Н. С., Бузук Г. Н., Таланов А. А., Иванов А. П., Кузьмичева Н. А., Горькова А. С. Неофициальные виды семейства вересковых как перспективные акваретики и уроантисептики. *Вестник фармации*. 2016;3(73):59–66.
6. Liu X.-J., Su H.-G., Peng X.-R., Bi H.-C., Qiu M.-H. An updated review of the genus *Rhododendron* since 2010: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Phytochemistry*. 2024;217:113899. DOI: 10.1016/j.phytochem.2023.113899.
7. Shi D., Xu M., Ren M., Pan E., Luo C., Zhang W., Tang Q. Immunomodulatory Effect of Flavonoids of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Leaves via the NF-κB Signal Pathway in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Journal of Immunology Research*. 2017;2017:5476903. DOI: 10.1155/2017/5476903.
8. Martău G. A., Bernadette-Emöke T., Odocheanu R., Soporan D. A., Bochiș M., Simon E., Vodnar D. C. *Vaccinium* Species (Ericaceae): Phytochemistry and Biological Properties of Medicinal Plants. *Molecules*. 2023;28(4):1533. DOI: 10.3390/molecules28041533.

9. Adhikari B., Marasini B.P., Rayamajhee B., Bhattarai B.R., Lamichhane G., Khadayat K., Adhikari A., Khanal S., Parajuli N. Potential roles of medicinal plants for the treatment of viral diseases focusing on COVID-19: A review. *Phytotherapy Research*. 2021;35(3):1298–1312. DOI: 10.1002/ptr.6893.
 10. Минович В.М. Фармакогностическое исследование представителей родов *Origanum* L. и *Rhododendron* L. флоры Восточной Сибири. Дис. ... докт. фарм. наук. Улан-Удэ; 2010. 392 с. Доступно по: <https://medical-diss.com/medicina/farmakognosticheskoe-issledovanie-predstaviteley-rodov-origanum-l-i-rhododendron-l-flory-vostochnoy-sibiri>. Ссылка активна на 03.05.2024.
 11. Кардашевская К.С., Чирикова Н.К. Изменение количественного содержания фенольных соединений в листьях *Chamaedaphne calyculata* (L.) Moench в Центральной Якутии. *Вестник Северо-Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова*. 2022;(3):5–13. DOI: 10.25587/SVFU.2022.30.98.001.
 12. Wei X., Zhao Z., Zhong R., Tan X. A comprehensive review of herbacetin: from chemistry to pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;279:114356. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114356.
 13. Tutunchi H., Naeini F., Ostadrahimi A., Hosseinzadeh-Attar M.J. Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19. *Phytotherapy Research*. 2020;34(12):3137–3147. DOI: 10.1002/ptr.6781.
 14. Motallebi M., Bhia M., Rajani H.F., Bhia I., Tabarraei H., Mohammadkhani N., Pereira-Silva M., Kasaii M.S., Nouri-Majd S., Mueller A.-L., Veiga F.J.B., Paiva-Santos A.C., Shakibaei M. Naringenin: A potential flavonoid phytochemical for cancer therapy. *Life Sciences*. 2022;305:120752. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120752.
 15. Harborne J.B., Williams C.A. A chemotaxonomic survey of flavonoids and simple phenols in leaves of the Ericaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 1973;66(1):37–54.
 16. Буданцев А.Л., ред. Растительные ресурсы России: дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейства Actinidaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae. СПб., М.: Товарищество научных изданий КМК; 2009. 512 с.
 17. Ștefănescu B.E., Szabo K., Mocan A., Crișan G. Phenolic Compounds from Five Ericaceae Species Leaves and Their Related Bioavailability and Health Benefits. *Molecules*. 2019;24(11):2046. DOI: 10.3390/molecules24112046.
 18. Shamilov A.A., Olennikov D.N., Pozdnyakov D.I., Bubenchikova V.N., Garsiya E.R. Investigation of phenolic compounds at the leaves and shoots *Arctostaphylos* spp. and their antioxidant and antityrosinase activities. *Natural Product Research*. 2022;36(24):6312–6317. DOI: 10.1080/14786419.2021.2025370.
 19. Tian Y., Liimatainen J., Alanne A.-L., Lindstedt A., Liu P., Sinkkonen J., Kallio H., Yang B. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chemistry*. 2017;220:266–281. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.145.
 20. Han J., Xu H.-H., Chen X.-L., Hu H.-R., Hu K.-M., Chen Z.-W., He G.-W. Total Flavone of *Rhododendron* Improves Cerebral Ischemia Injury by Activating Vascular TRPV4 to Induce Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;8919867. DOI: 10.1155/2018/8919867.
 21. Shi L., Jiang C., Xu H., Wu J., Lu J., He Y., Yin X., Chen Z., Cao D., Shen X., Hou X., Han J. Hyperoside ameliorates cerebral ischaemic-reperfusion injury by opening the TRPV4 channel *in vivo* through the IP₃-PKC signalling pathway. *Pharmaceutical Biology*. 2023;61(1):1000–1012. DOI: 10.1080/13880209.2023.2228379.
 22. Guo X., Dong Z., Li Q., Wan D., Zhong J., Dongzhi D., Huang M. Flavonoids from *Rhododendron nivale* Hook. f delay aging via modulation of gut microbiota and glutathione metabolism. *Phytomedicine*. 2022;104:154270. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154270.
- ## REFERENCES
1. Takhtadzhyan A.L., Fedorov A.A., Budantsev L.Yu. et al., editors. Plant life. Volume 5. Part 2. Flowering plants. Moscow: Prosveshchenie; 1981. 511 p. (In Russ.)
 2. Berezovskaya T.P., editor. Some issues of pharmacognosy of wild and cultivated plants of Siberia. Tomsk: Izdatelstvo Tomskogo universiteta; 1969. 229 p. (In Russ.)
 3. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XV edition. Moscow: Minister of Health of the Russian Federation; 2023. (In Russ.)
 4. Belousov M.V. Pharmacognostic characteristics and biological activity of representatives of the ericaceae family (Ericaceae) flora of Siberia and the Far East. [Dissertation.] Tomsk; 2004. 310 p. Available at: <https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskaya-kharakteristika-i-biologicheskaya-aktivnost-predstavitelei-semeistva-v>. Accessed: 03.05.2024. (In Russ.)
 5. Fursa N.S., Buzuk G.N., Talanov A.A., Ivanov A.P., Kuzmicheva N.A., Gorcova A.S. Non-official species of the ericaceae family as perspective akvaretics and uroantiseptics. *Vestnik Farmacii*. 2016;3(73):59–66. (In Russ.)
 6. Liu X.-J., Su H.-G., Peng X.-R., Bi H.-C., Qiu M.-H. An updated review of the genus *Rhododendron* since 2010: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Phytochemistry*. 2024;217:113899. DOI: 10.1016/j.phytochem.2023.113899.
 7. Shi D., Xu M., Ren M., Pan E., Luo C., Zhang W., Tang Q. Immunomodulatory Effect of Flavonoids of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Leaves via the NF-κB Signal Pathway in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Journal of Immunology Research*. 2017;2017:5476903. DOI: 10.1155/2017/5476903.
 8. Martău G.A., Bernadette-Emőke T., Odocheanu R., Soporă D.A., Bochiș M., Simon E., Vodnar D.C. Vaccinium Species (Ericaceae): Phytochemistry and Biological Properties of Medicinal Plants. *Molecules*. 2023;28(4):1533. DOI: 10.3390/molecules28041533.
 9. Adhikari B., Marasini B.P., Rayamajhee B., Bhattarai B.R., Lamichhane G., Khadayat K., Adhikari A., Khanal S., Parajuli N. Potential roles of medicinal plants for the treatment of viral diseases focusing on COVID-19: A review. *Phytotherapy Research*. 2021;35(3):1298–1312. DOI: 10.1002/ptr.6893.
 10. Минович В.М. Фармакогностическое исследование представителей родов *Origanum* L. и *Rhododendron* L. флоры Восточной Сибири. [Dissertation.] Улан-Удэ; 2010. 392 p. Available at: <https://medical-diss.com/medicina/farmakognosticheskoe-issledovanie-predstaviteley-rodov-origanum-l-i-rhododendron-l-flory-vostochnoy-sibiri>. Accessed: 03.05.2024. (In Russ.)
 11. Kardashevskaya K.S., Chirikova N.K. Quantitative changes in the content of phenolic compounds in leaves of *Chamaedaphne calyculata* (L.) Moench in Central Yakutia.

- Vestnik of the North-Eastern Federal University*. 2022;(3):5–13. (In Russ.). DOI: 10.25587/SVFU.2022.30.98.001.
12. Wei X., Zhao Z., Zhong R., Tan X. A comprehensive review of herbacetin: from chemistry to pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;279:114356. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114356.
13. Tutunchi H., Naeini F., Ostadrahimi A., Hosseinzadeh-Attar M.J. Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19. *Phytotherapy Research*. 2020;34(12):3137–3147. DOI: 10.1002/ptr.6781.
14. Motallebi M., Bhia M., Rajani H.F., Bhia I., Tabarraei H., Mohammadkhani N., Pereira-Silva M., Kasaii M.S., Nouri-Majd S., Mueller A.-L., Veiga F.J.B., Paiva-Santos A.C., Shakibaei M. Naringenin: A potential flavonoid phytochemical for cancer therapy. *Life Sciences*. 2022;305:120752. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120752.
15. Harborne J.B., Williams C.A. A chemotaxonomic survey of flavonoids and simple phenols in leaves of the Ericaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 1973;66(1):37–54.
16. Budancev A. L., editor. Plant resources of Russia: wild flowering plants, their component composition and biological activity. V. 2. Families Actinidiaceae – Malvaceae, Euforbiaceae – Haloragaceae. St. Petersburg, Moscow: Tovarihestvo nauchnyh izdaniy KMK; 2009. 513 p. (In Russ.)
17. Ștefănescu B.E., Szabo K., Mocan A., Crișan G. Phenolic Compounds from Five Ericaceae Species Leaves and Their Related Bioavailability and Health Benefits. *Molecules*. 2019;24(11):2046. DOI: 10.3390/molecules24112046.
18. Shamilov A.A., Olennikov D.N., Pozdnyakov D.I., Bubenichikova V.N., Garsiya E.R. Investigation of phenolic compounds at the leaves and shoots *Arctostaphylos* spp. and their antioxidant and antityrosinase activities. *Natural Product Research*. 2022;36(24):6312–6317. DOI: 10.1080/14786419.2021.2025370.
19. Tian Y., Liimatainen J., Alanne A.-L., Lindstedt A., Liu P., Sinkkonen J., Kallio H., Yang B. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chemistry*. 2017;220:266–281. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.145.
20. Han J., Xu H.-H., Chen X.-L., Hu H.-R., Hu K.-M., Chen Z.-W., He G.-W. Total Flavone of Rhododendron Improves Cerebral Ischemia Injury by Activating Vascular TRPV4 to Induce Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;8919867. DOI: 10.1155/2018/8919867.
21. Shi L., Jiang C., Xu H., Wu J., Lu J., He Y., Yin X., Chen Z., Cao D., Shen X., Hou X., Han J. Hyperoside ameliorates cerebral ischaemic-reperfusion injury by opening the TRPV4 channel *in vivo* through the IP₃-PKC signalling pathway. *Pharmaceutical Biology*. 2023;61(1):1000–1012. DOI: 10.1080/13880209.2023.2228379.
22. Guo X., Dong Z., Li Q., Wan D., Zhong J., Dongzhi D., Huang M. Flavonoids from Rhododendron nivale Hook. f delay aging via modulation of gut microbiota and glutathione metabolism. *Phytomedicine*. 2022;104:154270. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154270.



Оценка высвобождения лекарственных веществ из мягких лекарственных форм и прогнозирование проницаемости через кожный барьер (обзор)

Н. Б. Мельникова¹✉, И. А. Шеферов¹, А. А. Емашева¹, А. А. Шеферова²,
Д. А. Пантелеев², А. И. Сливкин³

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского». 603022, Россия, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России). 603005, Россия, г. Нижний Новгород, площадь Минина и Пожарского, д. 10/1

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»). 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ Контактное лицо: Мельникова Нина Борисовна. E-mail: melnikovanb@gmail.com

ORCID: Н. Б. Мельникова – <https://orcid.org/0000-0003-1335-1048>;

И. А. Шеферов – <https://orcid.org/0009-0007-5191-8996>;

А. А. Емашева – <https://orcid.org/0009-0008-6097-4831>;

А. А. Шеферова – <https://orcid.org/0009-0001-7645-3458>;

Д. А. Пантелеев – <https://orcid.org/0000-0003-4617-8608>;

А. И. Сливкин – <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>.

Статья поступила: 26.03.2024

Статья принята в печать: 10.06.2024

Статья опубликована: 10.06.2024

Резюме

Введение. В обзоре обсуждаются основные концепции высвобождения лекарственных веществ (ЛВ) из лекарственных форм (ЛФ) и кинетическое моделирование этого процесса по профилю растворения с использованием вертикальной диффузионной ячейки Франца.

Текст. Высвобождение ЛВ из ЛФ (мази, гели, трансдермальные пластыри и полимерные пленки) обычно описывают как процесс растворения ЛВ в биологической системе. Формально этот процесс в соответствии с фармакопейными методами оценивают, используя различные тесты на растворимость. Полученные на основании этих тестов экспериментальные данные обычно выполняют также и прогностическую функцию по отношению к прониканию ЛВ через кожный барьер и проницаемости среды. Наиболее часто для оценки высвобождения ЛВ и прогнозирования проницаемости используют вертикальные диффузионные ячейки Франца, выбирая тип системы диффузионных ячеек и тип мембраны, которые необходимы для высвобождения конкретного ЛВ. Теоретические аспекты высвобождения базируются на теории массопереноса веществ из полимерной матрицы в систему, имитирующую биологическую среду. Высвобождение ЛВ может осуществляться через механизмы пассивной диффузии по Фику и «нефиковской» диффузии, десорбцию ЛВ с внутренней стороны мембраны, а также по другим механизмам. Высвобождение ЛВ определяется как его липофильностью, природой мембраны, так и различными физико-химическими параметрами ЛВ. Одной из корреляционных характеристик массопереноса является оценка коэффициента проницаемости для конкретной, имитирующей кожу мембраны, описывающего скорость проникания вещества на единицу концентрации в единицах «расстояние/время». Примером корреляционных соотношений «структура – проницаемость» (QSPeR или QSPR) являются уравнения, связывающие константу проницаемости и липофильность с молекулярной массой ЛВ. В работе рассмотрены статистические методы анализа данных (MANOVA, ANOVA) и модельно-зависимые методы (нулевой порядок, первый порядок, модель Хигучи, модель Корсмейера – Пеппаса, модель Хиксона – Кроуэлла и др.). Идеальная доставка недеградируемых и недезагрегируемых ЛВ, как правило, описывает модель высвобождения реакции нулевого порядка. Для водорастворимых ЛВ из пористой матрицы более характерны модели реакции первого порядка. Наиболее часто для описания процесса высвобождения из гелей и дермальных пленок и пластырей используют кинетические модели дробных степенных функций в виде зависимости потока от времени в степени $t^{1/2}$ (модель Хигучи) или $t^{1/3}$ (модель Хиксона – Кроуэлла). Модель Корсмейера – Пеппаса позволяет оценить механизм массопереноса с диффузией по Фику или по другому процессу.

© Мельникова Н. Б., Шеферов И. А., Емашева А. А., Шеферова А. А., Пантелеев Д. А., Сливкин А. И., 2024

© Melnikova N. B., Sheferov I. A., Emasheva A. A., Sheferova A. A., Panteleev D. A., Slivkin A. I., 2024

Заключение. Математическое моделирование кинетики высвобождения ЛВ из мягких ЛФ является важным элементом для разработки и оптимизации их составов. Исследование высвобождения ЛВ из мягких ЛФ, в том числе ТТС и полимерных пленок, так же как и из твердых ЛФ, основано на установлении корреляционных соотношений кинетики профиля высвобождения и растворения. Основными моделями высвобождения независимо от ЛФ остаются модели: нулевого порядка, первого порядка, Корсмейера – Пеппаса, Хигучи, Хиксона – Кроуэлла, эмпирические или полуматематические константы которых существенно различаются в зависимости от ЛФ и механизма высвобождения (диффузия по Фику или другой механизм массопереноса ЛВ). Корреляционные соотношения QSPeR или QSPR, использующие коэффициенты проницаемости ($K_{\text{прониц}}$), диффузии и липофильности, позволяют получить информацию о массопереносе ЛВ через кожу.

Ключевые слова: кинетика высвобождения лекарственных веществ; математическое моделирование; мягкие лекарственные формы; проницаемость

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

Вклад авторов. Н. Б. Мельникова принадлежит основная идея разработки и написания данного обзора. И. А. Шеферов, А. А. Шеферова, Д. А. Пантелеев – экспериментальный обзор и поиск литературы. А. А. Емашева – математическое моделирование кинетики высвобождения. А. И. Сливкин – концептуализация и консультационная помощь при написании данного обзора.

Для цитирования: Мельникова Н. Б., Шеферов И. А., Емашева А. А., Шеферова А. А., Пантелеев Д. А., Сливкин А. И. Оценка высвобождения лекарственных веществ из мягких лекарственных форм и прогнозирование проницаемости через кожный барьер. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):52–65. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1793>

Evaluation of drug release from topical dosage forms and permeability prediction through the skin barrier (review)

Nina B. Melnikova¹✉, Ilya A. Sheferov¹, Anastasia A. Emasheva¹, Alyona A. Sheferova², Dmitry A. Panteleev², Aleksey I. Slivkin³

¹ National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod. 23, Gagarin avenue, Nizhny Novgorod, 603022, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Privolzhsky Research Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSBEI HE PRMU MOH Russia). 10/1, Minin and Pozharsky square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

³ Voronezh State University. 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394018, Russia

✉ **Corresponding author:** Nina B. Melnikova. **E-mail:** melnikovanb@gmail.com

ORCID: Nina B. Melnikova – <https://orcid.org/0000-0003-1335-1048>;

Ilya A. Sheferov – <https://orcid.org/0009-0007-5191-8996>;

Anastasia A. Emasheva – <https://orcid.org/0009-0008-6097-4831>;

Alyona A. Sheferova – <https://orcid.org/0009-0001-7645-3458>;

Dmitry A. Panteleev – <https://orcid.org/0000-0003-4617-8608>;

Aleksey I. Slivkin – <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>.

Received: 26.03.2024

Accepted: 10.06.2024

Published: 10.06.2024

Abstract

Introduction. The review considered the basic concepts of drug release and kinetic modeling of this process from dosage forms (DF) according to the dissolution profile using a vertical Franz diffusion cell.

Text. Drug release from dosage forms (ointments, gels, transdermal patches and polymer films) is usually described as the processes of drug dissolution in the biological system. Formally, this process, in accordance with pharmacopoeial methods, is assessed using various solubility tests. The theoretical aspects of drug release are based on the theory of mass transfer of substances from a polymer matrix into a system that simulates a biological environment. Drug release can be carried out via the passive diffusion mechanism according to Fick and "non-Fick" diffusion, drug desorption from the inner side of the membrane, as well as other mechanisms. Drug release is determined both lipophilicity and the membrane nature, both various physicochemical parameters of the drug. One of the correlation characteristics of mass transfer is the assessment of the permeability coefficient for a specific membrane that simulates skin. Permeability coefficient describes the rate of penetration of a drug per unit concentration in distance/time units. An example of relationship of "structure-permeability" correlation are the equations relating the permeability constant and lipophilicity to the molecular weight of the drug. The paper showed statistical methods of data analysis (MANOVA, ANOVA) and model-dependent methods (zero order, first order, Higuchi model, Korsmeyer – Peppas model, Hixson – Crowell model, etc.). The ideal drug delivery of non-degradable and non-disaggregating drugs describes as drug release model by zero-order reaction. For drug release of water-soluble drugs from a porous matrix, first-order reaction model is more typical. Kinetic models of fractional power functions are used usually as the cube root law (Hixson – Crowell model) or the square root law (Higuchi model) to describe the process of drug release from gels and dermal films and patches. The Korsmeyer – Peppas model allows us to evaluate the mechanism of mass transfer with Fickian diffusion or another process.

Conclusion. Mathematical modeling of the drug release kinetics from soft dosage forms is an important element for the development and optimization of their compositions. The study of the drugs release from soft dosage forms, including TTS and polymer films, as well as the release from solid dosage forms, is based on establishing correlations between the kinetics of the release and dissolution profile. The main release models, regardless of the DF, remain the following models: zero order, first order, Korsmeyer – Peppas, Higuchi, Hickson – Crowell, the empirical or semi-empirical constants of which vary significantly depending on the DF and the release mechanism (Fickian diffusion or another drug mass transfer mechanism). Correlation relationships QSPeR or QSPR, using the coefficients of permeability, diffusion and lipophilicity, provide information on the mass transfer of drugs through the skin.

Keywords: kinetics of drug release; math modeling; soft dosage forms; permeability

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. Nina B. Melnikova wrote the review and analyzed literature data. Ilya A. Sheferov, Alyona A. Sheferova, Dmitry A. Panteleev made literature review. Anastasia A. Emasheva reviewed kinetic modeling of drug release from dosage form based on dissolution profile. Aleksey I. Slivkin made conceptualization of the article.

For citation: Melnikova N. B., Sheferov I. A., Emasheva A. A., Sheferova A. A., Panteleev D. A., Slivkin A. I. Evaluation of drug release from topical dosage forms and permeability prediction through the skin barrier. *Drug development & registration*. 2024;13(3):52–65. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1793>

ВВЕДЕНИЕ

Особенностью высвобождения лекарственных веществ (ЛВ) из мягких ЛФ является возможность их переноса:

- 1) высвобождения до начальных слоев рогового слоя (liberation);
- 2) проникания (penetration) по всей глубине рогового слоя до эпидермиса (например, в гелях и мазях);
- 3) проникновения (permeation) в эпидермис через сложную структуру кожи;
- 4) трансдермального поглощения ЛВ через роговой слой и эпидермис в дерму, до кровеносных сосудов [1].

Все упомянутые барьеры проникания представляют собой липиды, имеющие различную структуру (кератиноциты, корнеоциты, корнеодесмосомы, церамиды, холестерин, свободные жирные кислоты и др.).

Ключевой проблемой мягких ЛФ является доставка ЛВ, или проникание, через кожу до кровеносных сосудов. Клетки рогового слоя эпидермиса представляют собой непреодолимый барьер для большинства веществ, за исключением молекул воды и короткоцепочечных спиртов. Возможны следующие пути проникновения ЛВ через кожу до кровеносного русла:

- 5) внутриклеточный (последовательно через клетки и прослойки липидной матрицы);
- 6) трансфолликулярный (через волосные фолликулы, потовые и сальные железы);
- 7) межклеточный (через межклеточное пространство – липидную матрицу) [2].

Диффузия гидрофильных ЛВ через клетки рогового слоя, по внутриклеточному пути, то есть через структурированную липофильную липидную матрицу, содержащую лишь незначительное количество воды, затруднена и лимитирует скорость трансдермального проникновения. Для очень гидрофобных лекарств, для которых транспорт через липофильное межклеточное пространство рогового слоя не вызывает затруднений, лимитирующей стадией процесса оказывается диффузия в гидратированные нижние слои эпидермиса и гидрофильную дерму. Такие гидрофобные ЛВ накапливаются в роговом слое и не могут достичь кровеносных сосудов, что заметно снижает их биодоступность. Введение в состав мягких ЛФ вспомогательных веществ (ПАВ, полимеры, транскутанты и др.) способно не только изменить их высвобождение из ЛФ, но и облегчить диффузию через кожный барьер.

Процессы высвобождения ЛВ из ЛФ – таблеток, капсул, трансдермальных терапевтических систем (ТТС), пленок или гелей – в биологическую среду традиционно сопоставляют с процессами растворения ЛВ в биологической системе [3, 4]. В связи с этим высвобождение основывается на тестах оценки растворимости ЛВ. С другой стороны, высвобождение ЛВ из ЛФ чаще всего сводится к прониканию или массопереносу веществ из полимерной матрицы (оболочки таблеток и капсул, основы ТТС, гелей и полимерных дермальных пленок [4–9]) в некую среду (вода, 0,9%-й раствор хлорида натрия, буферные растворы, этанол, раствор циклодекстринов и др.) при P ,

$T = \text{const}$, обычно при нормальном атмосферном давлении и температурах 32 или 37 °C [4–9].

Для оценки высвобождения или растворения ЛВ из мягких ЛФ, в отличие от твердых, необходимо учитывать диффузионные процессы массопереноса ЛВ через мембрану, имитирующую кожу. Наиболее часто для оценки высвобождения ЛВ и прогнозирования проницаемости используют вертикальные диффузионные ячейки Франца (рисунок 1) [9, 10]. Изучаемая мембрана (кожа животного, различные полимеры и др.) с нанесенной на нее ЛФ разделяет донорную и рецепторную камеры в водяной рубашке. Количество высвобожденного ЛВ из ЛФ определяют, отбирая аликвоту хроматографическим шприцем из порта отбора проб [10, 11]. В ячейках Франца высвобождение и проникание ЛВ рассматривают как диффузию или массоперенос ЛВ по градиенту концентраций через границы раздела, выбирая тот тип системы диффузионных ячеек и тип материала мембраны, которые необходимы для высвобождения конкретного ЛВ. Полученные на основании этих тестов экспериментальные данные обычно выполняют также и прогностическую функцию по отношению к прониканию ЛВ через кожный барьер и проницаемости среды.

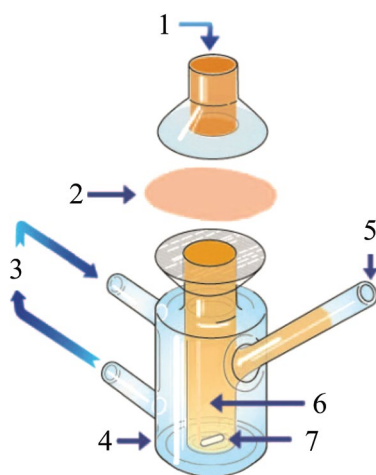


Рисунок 1. Схематическое представление ячейки Франца:

1 – донорное соединение; 2 – мембрана; 3 – нагрев/циркуляция; 4 – водяная рубашка; 5 – порт отбора проб; 6 – рецепторная камера; 7 – магнитная мешалка

Figure 1. Schematic representation of a Franz cell:

1 – donor compound; 2 – membrane; 3 – heating/circulation; 4 – water jacket; 5 – sampling port; 6 – receptor chamber; 7 – magnetic stirrer

Анализ литературных данных показывает, что проникание в мембрану и из мембраны в кожу может происходить как с диффузией по Фику или по другому

уравнению диффузии, так и без диффузии через мембрану, например в случае протекания высвобождения как процесса десорбции ЛВ с внешней стороны полимерной матрицы [11–15].

В связи с этим для оптимизации нужного состава любой ЛФ необходимо изучить кинетику высвобождения ЛВ, позволяющую выявить механизм процесса массопереноса при проникании ЛВ через мембрану. Важным является сопоставление липофильности ЛВ и основы с данными по кинетике высвобождения, позволяющими осуществить контроль высвобождения и пролонгированность действия ЛФ.

В этом обзоре будут рассмотрены основные концепции высвобождения ЛВ и кинетическое моделирование высвобождения ЛВ из ЛФ по профилю растворения.

Основные положения оценки высвобождения *in vitro*

При рассмотрении проникания оценивают поток (J), равный количеству проникающего через мембрану вещества на единицу площади в циркулирующую систему в единицу времени. Размерность потока $[J] = \text{масса} / (\text{площадь} \cdot \text{время})$, например $\text{г} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ или $\text{мкг} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$, а также выражается в единицах радиоактивности/площади/времени [12].

$$J = (\partial Q / \partial \tau)_{p,T} = (\partial m / \partial \tau)_{p,T} / A_s, \quad (1)$$

где $Q = m/A_s$; m – количество вещества; A_s – площадь, через которую идет массоперенос; τ – время.

Диффузия как процесс проникания описывается первым законом Фика [16, 17], в котором диффузионный поток (J) характеризуется постоянным градиентом концентраций (dc/dx), поддерживаемым вводом частиц ЛВ в одну область и выводом их из другой.

$$J = -D_f \cdot dc/dx, \quad (2)$$

где D_f – коэффициент диффузии, мера или свойство ЛВ, определяющее, насколько оно проникает через конкретный барьер (мембрана, пористое тело, полимер, кожа); x – толщина слоя, см. Размерность коэффициента диффузии $[D_f] = \text{площадь/время}$, например $\text{см}^2/\text{с}$.

Любое вещество, нанесенное на ткань или искусственную мембрану, будет иметь время задержки, то есть время, необходимое для проникновения через мембрану и диффундирования в рецепторную жидкость, а затем, наконец, достижения устойчивого состояния равновесия в диффузионном процессе. Различают индукционный период (лаг-фаза) и стационарный поток $J_{ss} = Q/(A \cdot \tau)$, который характеризуется постоянной скоростью высвобождения. Время, необходимое для достижения устойчивого состояния, будет зависеть от нескольких факторов: проницаемости исследуемой ткани (например, кожи) или мембраны, свойств самого вещества и скорости пото-

ка рецепторной жидкости, если используются диффузионные ячейки проточного типа.

Если количество проникающего вещества, нанесенного на мембрану, было бесконечной дозой, то константу проницаемости ($K_{\text{прониц.}}$) можно рассчитать по соотношению [12]:

$$K_{\text{прониц.}} = Q/[A \cdot \tau \cdot (C_{\text{out}} - C_{\text{inner}})], \quad (3)$$

где Q – количество соединения, транспортируемого через мембрану за время τ (мин); C_{out} и C_{inner} – концентрации соединения на внешней стороне (out – донорная сторона) и внутренней стороне (inner – рецепторная сторона) мембраны соответственно (мкг/см^3); A – площадь открытой мембраны в см^2 . Обычно C_{out} можно рассматривать как исходную концентрацию ЛВ в наносимой ЛФ при C_{inner} , равном 0. Следовательно, коэффициент проницаемости ($K_{\text{прониц.}}$) описывает скорость проникновения проникающего вещества на единицу концентрации, выраженную в единицах «расстояние/время», например см/мин или см/ч .

Диффузия *in vitro* обычно представляет собой пассивную диффузию пермеанта – молекулярных частиц, перемещающихся через ткань/мембрану или внутрь нее. Проникновение представляет собой движение проникающего вещества через мембрану, которое включает сначала разделение мембраны, а затем диффузию через мембрану. Проникновение может происходить в мембрану без обязательной диффузии или прохождения через мембрану, из носителя в донорской камере через искусственную или биологическую мембрану в рецепторную жидкость в рецепторной камере, без учета систем доставки, таких как ионофорез и микроиглы.

Наиболее простое модельное приближение рассматривает кожу как инертную гомогенную мембрану, на верхней (обращенной к ТТС или полимерной пленке) стороне которой концентрация лекарства очень велика, а на ее нижней стороне – пренебрежимо мала. Это позволяет записать уравнение следующим образом [12]:

$$J = -D(\partial C / \partial x)_{P, \tau} \approx \frac{DC_{\text{ЛВ}}^0}{h} \approx \frac{DKC_{\text{ЛВ}}^{\text{полимер}}}{h}, \quad (4)$$

где $C_{\text{ЛВ}}^0$ и $C_{\text{ЛВ}}^{\text{полимер}}$ – соответственно концентрации ЛВ на поверхности мембраны и в полимере; h – толщина мембраны, $K = C_{\text{ЛВ}}^0 / C_{\text{ЛВ}}^{\text{полимер}}$ – коэффициент распределения диффундирующего вещества между мембраной (кожей) и полимером, в том числе ТТС.

Массоперенос вещества происходит в межклеточном пространстве эпидермиса, что заметно увеличивает диффузионный путь по сравнению с толщиной h мембраны, кроме того, значения коэффициента распределения K и D трудно, а подчас и невозможно определить. Поэтому перечисленные параметры принято объединять:

$$K_{\text{прониц.}} = KD/h, \quad (5)$$

где $K_{\text{прониц.}}$ – коэффициент проницаемости, имеющий размерность скорости (см/ч или см/мин). Совместное решение уравнений приводит к соотношению:

$$J = K_{\text{прониц.}} \cdot C_{\text{ЛВ}}^{\text{полимер}}, \quad (6)$$

Следует отметить, что для многих полимеров и ТТС (особенно пластырей) постоянная скорость массопереноса ЛВ через кожу устанавливается лишь после индукционного периода τ^* . На основе второго закона Фика

$$\partial C / \partial \tau = D \cdot (\partial^2 C / \partial x^2), \quad (7)$$

при идеализированных граничных условиях (кожа – гомогенная инертная мембрана) и $\tau \rightarrow \infty$ получено уравнение, хорошо описывающее такие зависимости $Q(t)$, характеризующие псевдостационарное поведение:

$$Q \approx (DC_{\text{ЛВ}}^0/h) \cdot (\tau - h^2/(6D)) \approx (DC_{\text{ЛВ}}^0/h) \cdot (t - \tau^*), \quad (8)$$

где $\tau^* = h^2/(6D)$.

Поскольку $C_{\text{ЛВ}}^0 = K \cdot C_{\text{ЛВ}}^{\text{полимер}}$, дифференцирование уравнения по времени приводит к соотношению:

$$dQ/d\tau = J \approx DC_{\text{ЛВ}}^0/h \approx DKC_{\text{ЛВ}}^{\text{полимер}}/h \approx K_{\text{прониц.}} \cdot C_{\text{ЛВ}}^{\text{полимер}}. \quad (9)$$

Таким образом, поскольку концентрация ЛВ в полимере или ТТС, как правило, известна, экспериментальные зависимости $Q(t)$, соответствующие стационарным или псевдостационарным условиям, используются для определения коэффициентов проницаемости кожи для различных веществ и изучения механизмов высвобождения ЛВ.

Липофильность ЛВ как фактор его проникания в полимерную матрицу

Распределение компонента ЛВ между различными фазами (матрицей полимера и рецепторной жидкостью) будет зависеть от распределения вещества в эмульсии или суспензии внутри ЛФ, то есть от его липофильности (P) [17–20].

Липофильность вещества определяют как отношение его концентрации в нормальном октаноле к концентрации в водной фазе (вода, буферный раствор) и обычно выражают в логарифмической форме [21]:

$$\lg P = \lg \frac{[C_{\text{ЛВ}}]_{\text{липид}}}{[C_{\text{ЛВ}}]_{\text{вода}}} = \lg \frac{C_{\text{н-октанол}}}{C_{\text{вода}}}. \quad (10)$$

Липофильность (P) обычно сопоставляют с коэффициентом распределения/миграции из ЛФ в роговой слой K_M , где $C_{\text{ЛВ}}$ (пенетранта) является мерой количества сольватированных частиц проникающего ЛВ:

$$K_M = \frac{C_{\text{пенетранта в роговом слое}}}{C_{\text{пенетранта в ЛФ}}}. \quad (11)$$

Последнее уравнение показывает, что распределение ЛВ в липофильном роговом слое усиливается, если ЛВ имеет большую липофильность в препарате. В качестве меры коэффициента распределения K_M и модели распределения вещества используют липофильность. Поскольку на разделение ЛВ в полимере, ТТС и мембране влияет диффузия, то для определения проникновения через кожу (проницаемость кожи) объединяют понятия K_M и P , используя, например, коэффициент проницаемости:

$$K_{\text{прониц.}} = \frac{P_{\text{октанол/вода}} \cdot D}{L}, \quad (12)$$

где $K_{\text{прониц.}}$ – коэффициент проницаемости в единицах скорости (м/с, см/мин, см/ч и т.д.); $P_{\text{октанол/вода}}$ – липофильность, или коэффициент распределения октанол/вода; D – коэффициент диффузии; L – длина диффузионного пути проникающей молекулы.

Удобно использовать корреляционные соотношения «структура – проницаемость» (QSPeR или QSPR), в которых дескрипторами выступают липофильность, молекулярная масса и проницаемость, как, например, в работах Гая, Поттса, Флина и др. [17–19, 22, 23]:

$$\log K_{\text{прониц.}} = 0,71 \log P_{\text{октанол/вода}} - 0,0061 M_t - 6,3. \quad (13)$$

Для прогнозирования используют данные, полученные в кинетических опытах *in vitro* с использованием кожи человека, значения P , данные о других физико-химических параметрах веществ.

Математическое моделирование кинетики высвобождения ЛВ

Исследование высвобождения ЛВ является важным инструментом использования современной концепции приготовления ЛФ, целью которой является повышение их эффективности. Для этой цели использование математического моделирования оказывается очень полезным, поскольку этот подход позволяет спрогнозировать кинетику высвобождения до того, как будут реализованы системы доставки. Этот прием позволяет оценить некоторые важные физические параметры, например коэффициент диффузии ЛВ, и прибегнуть к подбору математической модели на основе экспериментальных данных о высвобождении.

Высвобождение ЛВ из ЛФ через полимерную матрицу зависит от времени диффузионного процесса, и скорость изменения концентраций пропорциональна кривизне (второй производной) зависимости концентрации от расстояния и описывается вторым законом Фика [16]:

$$\partial C / \partial t = D \cdot (\partial^2 C / \partial x^2). \quad (14)$$

К некоторому моменту времени устанавливается некоторое распределение концентраций, а затем происходит рассредоточение без пополнения градиента. Например, слой растворимого вещества распространяется по поверхности растворителя и распределение концентраций в растворе изменяется по мере того, как вещество растворяется или высвобождается.

Для решения дифференциального уравнения диффузии необходимо точно установить граничные условия. Например, в нулевой момент времени граничные условия таковы, что все молекулы растворенного вещества Q сконцентрированы в одной плоскости при $x = 0$.

Значение уравнения диффузии состоит в том, что с его помощью можно предсказать концентрацию в любой точке системы в любое время.

Фундаментальный принцип оценки кинетики высвобождения ЛВ был предложен Нойесом и Уитни в 1897 году как определение скорости процесса растворения твердых веществ (реакция первого порядка) [24]:

$$dQ/dt = KA(C_s - C_t), \quad (15)$$

где Q – масса на поверхности A , перешедшая в раствор ко времени t за счет изменения концентрации ($C_s - C_t$), где C_t – концентрация в момент времени t , а C_s – равновесная растворимость ЛВ при температуре эксперимента. Когда C_t составляет менее 15 % от насыщенной растворимости C_s , C_t оказывает незначительное влияние на скорость растворения твердого вещества. При таких обстоятельствах растворение твердого вещества происходит в условиях «потока». При этом площадь поверхности A не является постоянной, за исключением случаев, когда количество присутствующего вещества превышает растворимость при насыщении или первоначально, когда растворяются лишь небольшие количества ЛВ.

Бруннер и Нернст использовали закон диффузии Фика [24], чтобы установить связь между константой в уравнении (16) и коэффициентом диффузии растворенного вещества в виде уравнения:

$$K = DA/hV, \quad (16)$$

где D – коэффициент диффузии; A – площадь поверхности растворения или площадь диффузионного слоя; V – объем раствора; h – толщина диффузионного слоя. При формулировании своих теорий Нернст и Бруннер предположили, что процесс на поверхности протекает значительно быстрее, чем процесс переноса, и что линейный градиент концентрации ограничивается слоем раствора, прилипшим к твердой поверхности. Идеальное состояние никогда не может быть достигнуто, поскольку фактическая поверхность постоянно изменяется по мере развития процессов растворения во время обычного определения высвобождения ЛВ.

В обзоре мы рассмотрели следующие методы исследования кинетики высвобождения ЛВ из состава с контролируемым высвобождением:

- статистические методы [анализ данных, планирование повторных измерений, многомерный подход (MANOVA: многомерный дисперсионный анализ)] [24];
- модельно-зависимые методы (нулевой порядок, первый порядок, модель Хигучи, модель Корсмейера – Пеппаса, модель Хиксона – Кроуэлла, модель Бейкера – Лонсдейла, модель Вейбулла и т. д.) [24–34].

Статистические методы

Метод анализа данных исследования по моно- и парным t-тестам Стьюдента можно использовать на первом этапе для сравнения данных профиля растворения как в графическом, так и в числовом виде. Данные профиля растворения иллюстрируются графически путем построения графика средних данных профиля растворения для каждого состава с погрешностями в пределах двух стандартных ошибок в каждый момент времени растворения. Затем данные профилей растворения суммируются численно и оцениваются 95 % доверительные интервалы для различий средних профилей растворения в каждый момент времени растворения.

Многомерный подход (MANOVA) рекомендуется использовать на схемах повторяющихся измерений [24]. Для статистических методов использовался SPSS 10.0 для Windows [24]. Поскольку данные собирались в виде повторных измерений с течением времени на одной и той же экспериментальной установке, был применен план повторных измерений. По сравнению с моно- и парными t-тестами Стьюдента основным преимуществом этой схемы является повышенная точность.

При повторных измерениях, ANOVA, содержащих факторы повторных измерений с более чем двумя уровнями, в расчетах используются дополнительные специальные приложения с учетом сложной симметрии и сферичности. Поскольку эти предположения редко выполняются, подход MANOVA к повторным измерениям ANOVA приобрел популярность в последние годы. Предположение сложной симметрии требует, чтобы дисперсии и ковариации различных повторных измерений были однородными. Это достаточное условие для того, чтобы одномерный критерий «F» для повторных измерений был действительным. Предположение о сферичности является необходимым и достаточным условием для того, чтобы F-тест был действительным. Если предположения о сложной симметрии или сферичности были нарушены, одномерная таблица ANOVA даст ошибочные результаты.

Методы кинетического моделирования

Данные методы основаны на различных математических функциях, описывающих профиль растворения. После выбора подходящей функции оцениваются профили растворения в зависимости от параметров производной модели (таблицы 1, 2). Для определения подходящей кинетической модели высвобождения ЛВ, описывающей профиль растворения, используется модуль нелинейной регрессии в программе STATISTICA 5.0.

Подходы, зависящие от модели, включали модели нулевого порядка, первого порядка, второго и псевдоторого порядка, Хигучи, Хиксона – Кроуэлла, Корсмейера – Пеппаса, Бейкера – Лонсдейла, Вейбулла, Хопфенберга, Гомпертца и регрессионные модели [24–34].

Растворение ЛВ из ЛФ, которые не дезагрегируют и медленно высвобождают ЛВ, можно представить уравнением нулевого порядка [24–33]:

$$Q_t = Q_0 + k_0 t, \quad (17)$$

где Q_t – количество ЛВ, растворенного за время t ; Q_0 – начальное количество ЛВ в растворе (в большинстве случаев $Q_0 = 0$); k_0 – константа высвобождения нулевого порядка, выраженная в единицах «концентрация/время».

Уравнение нулевого порядка можно использовать для описания растворения ЛВ в нескольких типах ЛФ с модифицированным высвобождением, как в случае некоторых ТТС, так и в случае матричных таблеток с малорастворимыми ЛВ в оболочке, осмотических систем и т. д.

Модель высвобождения ЛВ по реакции первого порядка также использовалась для описания всасывания и/или выведения некоторых ЛВ, хотя сложно интерпретировать механизм этого процесса на теоретической основе [24–33]. Интегральная и дифференциальная формы уравнения высвобождения ЛВ в соответствии с кинетикой первого порядка приведены ниже:

$$Q_t = Q_0 \exp(-k_1 t), \quad (18)$$

$$\log \frac{Q_0}{Q_t} = k_1 t / 2,303, \quad (19)$$

где Q_0 – начальная концентрация ЛВ; k_1 – константа скорости первого порядка в единицах времени t^{-1} .

Полученные данные интерпретируются в виде линейной зависимости логарифма совокупного процента оставшегося препарата от времени, что дает прямая с наклоном $k/2,303$. Уравнение первого порядка можно использовать для описания растворения ЛВ в ЛФ, например в формах, содержащих водорастворимые ЛВ в пористой матрице.

Таблица 1. Кинетическое моделирование высвобождения ЛВ из ЛФ по профилю растворения
Table 1. Kinetic modeling of drug release from dosage form based on dissolution profile

Модель высвобождения, ссылка Release model, link	Уравнение The equation	$y = f(x)$	Физ. смысл k Physical meaning k	Интерпретация Interpretation
Реакция нулевого порядка, [24–34] Zero order model [24–34]	$Q_t = Q_0 + k_0 \tau$ где Q_t и Q_0 – количество ЛВ в рецепторной камере при τ и $\tau = 0$ $Q_t = Q_0 + k_0 \tau$ where Q_t and Q_0 are the number of drugs in the receptor chamber at τ and $\tau = 0$	$x = \tau$ $y = Q_t$	$k_0 = \text{tg } \alpha$ $[k_0] = \frac{\text{мкг}}{\text{см}^2 \cdot \text{мин}}$ $k_0 = \text{tg } \alpha$ $[k_0] = \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2 \cdot \text{min}}$	Идеальная доставка недеградируемых и недезагрегируемых ЛВ, уровень ЛВ в крови постоянный на протяжении всего процесса доставки Ideal delivery of non-degradable and non-disaggregable drugs, the level of drugs in the blood is constant throughout the entire delivery process
Реакция первого порядка [24–34] First order model [24–34]	$Q_t = Q_0 \exp(-k_1 \tau)$ $\frac{d[Q]}{d\tau} = -k_1[Q]$ $\lg \frac{Q_0}{Q_t} = k_1 \tau / 2,303$ $\ln \frac{Q_0}{Q_t} = k_1 \tau$	$x = \tau$ $y = \ln \frac{Q_0}{Q_t}$	$k_1 = -\text{tg } \alpha$ $[k_1] = \text{мин}^{-1}$ $k_1 = -\text{tg } \alpha$ $[k_1] = \text{min}^{-1}$	Для растворения ЛФ с водорастворимыми ЛВ из пористой матрицы For dissolving dosage forms with water-soluble drugs from a porous matrix
Реакция второго порядка [24] Second order model [24]	$\frac{d[Q]}{d\tau} = k_2[Q]^2$ $\frac{1}{Q_t} - \frac{1}{Q_0} = k_2 \tau$	$x = \tau$ $y = 1/Q_t$	$k_2 = -\text{tg } \alpha$ $[k_2] = \frac{\text{см}^2}{\text{мкг} \cdot \text{мин}}$ $k_2 = -\text{tg } \alpha$ $[k_2] = \frac{\text{cm}^2}{\mu\text{g} \cdot \text{min}}$	Высвобождение ЛВ протекает по механизму десорбции из полимерной матрицы Drug release occurs through the mechanism of desorption from the polymer matrix

Окончание таблицы 1

Модель высвобождения, ссылка Release model, link	Уравнение The equation	$y = f(x)$	Физ. смысл k Physical meaning k	Интерпретация Interpretation
Реакция псевдовторного порядка [32] Pseudo-second order model [32]	$\frac{d[Q]}{d\tau} = k_2 [Q]^2$ $\frac{\tau}{Q_e} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{\tau}{Q_e}$ где Q_e – максимальное количество ЛВ в акцепторной камере $\frac{d[Q]}{d\tau} = k_2 [Q]^2$ $\frac{\tau}{Q_e} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{\tau}{Q_e}$ where Q_e – the maximum number of drugs in the acceptor chamber	$x = \tau$ $y = \tau/Q_e$	$k_2 = \frac{1}{b \cdot Q_e^2}$ $[k_2] = \frac{cm^2}{mkg \cdot min}$ где b – параметр, отражающий диффузионный процесс $k_2 = \frac{1}{b \cdot Q_e^2}$ $[k_2] = \frac{cm^2}{\mu g \cdot min}$ where b – parameter reflecting the diffusion process	Высвобождение ЛВ протекает по механизму десорбции из полимерной матрицы, лимитируемому диффузией в гранулах сорбента Drug release occurs through the mechanism of desorption from the polymer matrix, limited by diffusion in sorbent granules

Таблица 2. Примеры кинетического моделирования высвобождения ЛВ из ЛФ по профилю растворения
Table 2. Examples of kinetic modeling of drug release from LF according to the dissolution profile

Модель высвобождения, ссылка Release model, link	Уравнение The equation	$y = f(x)$	Физический смысл k Physical meaning k	Интерпретация Interpretation
Корсмейер – Пеппас, [24–33] Korsmeyer – Peppas [24–33]	$\frac{Q_t}{Q_e} = k_{kp} \tau^n$ $\ln \frac{Q_t}{Q_e} = n \ln \tau + \ln k_{kp}$ где $\ln \frac{Q_t}{Q_e}$ – доля ЛВ, высвободившегося к τ; n – показатель степени высвобождения $\frac{Q_t}{Q_e} = k_{kp} \tau^n$ $\ln \frac{Q_t}{Q_e} = n \ln \tau + \ln k_{kp}$ where $\ln \frac{Q_t}{Q_e}$ – the fraction of the drug released by τ; n – release rate indicator	$x = \ln \tau$ $y = \ln \frac{Q_t}{Q_e}$	$k_{kp} = e^b$ где $[k_{kp}]$ – безразмерная константа скорости высвобождения $k_{kp} = e^b$ where $[k_{kp}]$ – dimensionless, release rate constant	n – экспонента высвобождения – отражает механизм транспорта ЛВ ($0,2 < n < 0,5$ – по Фику или $n > 0,5$ – не по Фику) и показывает скорость процесса как функцию времени n – release exponent that reflects the mechanism of drug transport ($0.2 < n < 0.5$ – according to Fick) and shows the speed of the process as a function of time

Модель высвобождения, ссылка Release model, link	Уравнение The equation	$y = f(x)$	Физический смысл k Physical meaning k	Интерпретация Interpretation
Хигучи [24, 30] Higuchi [24, 30]	$Q_t = k_H \tau^{1/2} = [D\varepsilon/t(2A - \varepsilon C_s)C_s \tau]^{1/2}$ где D – коэффициент диффузии; C_s – растворимость ЛВ в акцепторной жидкости; ε – пористость; A – концентрация ЛВ; t – извилистость $Q_t = k_H \tau^{1/2} = [D\varepsilon/t(2A - \varepsilon C_s)C_s \tau]^{1/2}$ where D – the diffusion coefficient; C_s – the solubility of the drug in the acceptor liquid; ε – porosity; A – drug concentration; t – tortuosity	$x = \tau^{1/2}$ $y = Q_t$	$k_H = \text{tg} \alpha$ $k_H = D\varepsilon/t(2A - \varepsilon C_s)C_s^{1/2}$ $[k_H] = \frac{\text{мкг}}{\text{см}^2 \cdot \text{мин}^{1/2}}$ где k_H – отражает соответствие свойств ЛВ (растворимость, коэффициент диффузии) и матрикса (извилистость, пористость) $k_H = \text{tg} \alpha$ $k_H = D\varepsilon/t(2A - \varepsilon C_s)C_s^{1/2}$ $[k_H] = \frac{\mu\text{г}}{\text{см}^2 \cdot \text{min}^{1/2}}$ where k_H – reflects the correspondence between the properties of the drug (solubility, diffusion coefficient) and the matrix (tortuosity, porosity)	Растворение и высвобождение в условиях постоянной диффузии ЛВ и незначительного набухания матрикса с учетом растворимости ЛВ в матриксе и пористости матрикса Dissolution and release under conditions of constant drug diffusion and slight swelling of the matrix, taking into account the solubility of the drug in the matrix and matrix porosity
Хиксон – Кроуэлл, [24–33] Hixson – Crowell [24–33]	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = k_{HC} \tau$	$x = \tau$ $y = Q_t^{1/3}$	$k_{HC} = \text{tg} \alpha$ $[k_{HC}] = \frac{\text{мкг}^{1/3}}{\text{см}^{2/3} \cdot \text{мин}}$ где k_{HC} – учитывает соотношение «поверхность – объем» $k_{HC} = \text{tg} \alpha$ $[k_{HC}] = \frac{\mu\text{г}^{1/3}}{\text{см}^{2/3} \cdot \text{min}}$ where k_{HC} – takes into account the surface-volume relationship	Применимо к таблеткам и ЛФ, в которых имеет место соотношение «поверхность – объем» Applicable to tablets and dosage forms in which surface-volume relationships occur

Первый пример математической модели, описывающей высвобождение ЛВ из матричной системы, был предложен Хигучи в 1961 году [30]. Первоначально задуманная для плоских систем, она затем была распространена на различные геометрические и пористые системы. Эта модель основана на гипотезе о том, что начальная концентрация ЛВ в матрице намного превышает его растворимость; распространение ЛВ происходит только в одном измерении (пограничный эффект должен быть незначительным); частицы ЛВ намного меньше толщины системы; набухание и растворение матрикса незначительны; диффузия ЛВ постоянная; в среде высвобождения всегда достигаются идеальные условия погружения.

Соответственно, уравнение для этой модели:

$$Q_t = k_H \tau^{1/2} = [D\varepsilon/t(2A - \varepsilon C_s)C_s \tau]^{1/2}, \quad (20)$$

где Q_t – количество ЛВ, выделившееся за время t на единицу площади A ; C – начальная концентрация ЛВ; C_s – растворимость ЛВ в матричной среде; D – коэффициент диффузии молекул ЛВ в матрице.

Это соотношение справедливо в течение всего времени, за исключением случаев, когда достигается полное истощение ЛВ в терапевтической системе.

Модель Хигучи можно использовать для описания растворения ЛВ из нескольких типов ЛФ с модифицированным высвобождением, как в случае некоторых ТТС и матричных таблеток с водорастворимыми ЛВ [17].

Пример моделей высвобождения, основанных на степенных функциях, представлен уравнениями Хиксона и Кроуэлла [24–33]. Подход основан на положении, что идеальная площадь сферической частицы пропорциональна кубическому корню из ее объема. Соотношение Хиксона – Кроуэлла представлено ниже:

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = k_{HC} \tau, \quad (21)$$

где Q_0 – исходное количество ЛВ в ЛФ, Q_t – оставшееся количество ЛВ в ЛФ в момент времени t , а k_{HC} – константа Хиксона – Кроуэлла, учитывающая соотношение «поверхность – объем». Уравнение описывает высвобождение из систем, в которых происходит изменение площади поверхности и диаметра частиц или таблеток. Для изучения кинетики высвобождения ЛВ *in vitro*, были представлены в виде кубического корня процентного содержания ЛВ, оставшегося в матрице, в зависимости от времени.

Это выражение применимо к таким ЛФ, как таблетки, где растворение происходит в плоскостях, параллельных поверхностям ЛВ, если размеры таблетки уменьшаются пропорционально, таким образом, что первоначальная геометрическая форма остается постоянной все время.

Близкой степенной моделью является модель Корсмейера – Пеппаса [24–33]:

$$\frac{Q_t}{Q_e} = k_{KP} \tau^n, \quad (22)$$

где Q_t/Q_e – доля ЛВ, высвободившаяся в момент времени t , k_{KP} – константа скорости высвобождения, n – показатель степени высвобождения. Значение n используется для характеристики различного высвобождения матриц цилиндрической формы. В этой модели значение n характеризует механизм высвобождения ЛВ, как описано в таблице 3.

Для цилиндрических таблеток $0,45 \leq n$ соответствует механизму диффузии по Фику, $0,45 < n < 0,89$ – транспорту, не подчиняющемуся уравнению Фика, $n = 0,89$ – релаксационному транспорту и $n > 0,89$ – Supercase II transport. Чтобы узнать показатель степени n , следует использовать только ту часть кривой высвобождения, где $Q_t/Q_e < 0,6$. Для изучения кинетики высвобождения ЛВ *in vitro*, были

Таблица 3. Интерпретация механизмов диффузии ЛВ из полимерных пленок

Table 3. Interpretation of drug diffusion from polymer films

Показатель высвобождения (n) Release rate (n)	Механизм транспорта ЛВ Drug transport mechanism	Скорость высвобождения как функция времени Release rate as a function of time
0,5	Фиковская диффузия Fickian diffusion	$t^{-0,5}$
$0,45 < n = 0,89$	Нефиковский тип переноса Non-Fick type of transfer	t^{n-1}
0,89	Диффузия с постоянной скоростью доставки ЛВ или релаксационный транспорт Diffusion with a constant rate of drug delivery or relaxation transport (Case II transport)	Высвобождение нулевого порядка Zero Order Release
Выше чем 0,89 Higher than 0,89	Диффузия с постоянной скоростью доставки ЛВ Diffusion with constant drug delivery rate (Supercase II transport)	t^{n-1}

Таблица 4. Примеры кинетического моделирования высвобождения
Table 4. Release Kinetic Modeling Examples

ЛФ Dosage form	ЛВ Drug	Кинетическая модель высвобождения ЛВ Kinetic model of drug release	Ссылка References
Пленка Film	Ибупрофен Ibuprofen	Нулевой порядок $Q_t = Q_0 + k_0 \tau$ Zero order $Q_t = Q_0 + k_0 \tau$	[35]
Мазь Ointment	Лотепреднол Loteprednol	Хигучи $Q_t = k_H \tau^{1/2} = [D\varepsilon/t(2A - \varepsilon C_s) C_s \tau]^{1/2}$ Higuchi $Q_t = k_H \tau^{1/2} = [D\varepsilon/t(2A - \varepsilon C_s) C_s \tau]^{1/2}$	[36]
Гель Gel	Пропранолол, метронидазол, цефалексин Propranolol, metronidazole, cephalexin	Нулевой порядок $Q_t = Q_0 + k_0 \tau$ Zero order $Q_t = Q_0 + k_0 \tau$	[37]
Трансдермальный пластырь Transdermal patch	Амоксицилин, ампициллин, канамицин Amoxicillin, ampicillin, kanamycin	Хигучи $Q_t = k_H \tau^{1/2} = [D\varepsilon/t(2A - \varepsilon C_s) C_s \tau]^{1/2}$ Higuchi $Q_t = k_H \tau^{1/2} = [D\varepsilon/t(2A - \varepsilon C_s) C_s \tau]^{1/2}$	[38]

нанесены на график в виде логарифма кумулятивного процента высвобождения ЛВ в зависимости от логарифма времени.

Некоторые примеры кинетического моделирования высвобождения приведены в таблице 4.

В целом следует отметить, что несмотря на первоначальное развитие теория высвобождения ЛВ базировалась на основах растворения твердых ЛВ (Хигучи и др.), в дальнейшем все основные положения, приближения и уровнения могут быть применимы для оценки высвобождения ЛВ из мягких ЛФ, липосом, микросфер [39–40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, математическое моделирование, разработка которого требует понимания всех явлений, влияющих на кинетику высвобождения ЛВ, имеет очень важное значение при оптимизации процесса создания ЛФ. Модель можно рассматривать как «математическую форму некоторых аспектов проникания ЛВ», которая в данном случае отождествляется с ансамблем явлений, управляющих кинетикой высвобождения.

В целом следует отметить, что для разработки и оптимизации состава новых ЛФ, в особенности таких, как гели, мази, трансдермальные терапевтические системы, и обеспечения контроля высвобождения и пролонгированности действия ЛВ необходимо исследовать кинетические особенности высвобождения ЛВ с учетом его липофильности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Pünnel L. C., Lunter D. J. Film-Forming Systems for Dermal Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2021;13(7):932. DOI: 10.3390/pharmaceutics13070932.
2. Patil P. B., Datir S. K., Saudagar R. B. A Review on Topical Gels as Drug Delivery System. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2019;9(3-s):989–994. DOI: 10.22270/jddt.v9i3-s.2930.
3. Chien Y. W., Liu J.-C. Transdermal Drug Delivery Systems. *Journal of Biomaterials Applications*. 1986;1(2):183–206. DOI: 10.1177/088532828600100202.
4. Williams A. Transdermal and Topical Drug Delivery. London: Pharmaceutical Press; 2003. 242 p.
5. Karki S., Kim H., Na S.-J., Shin D., Jo K., Lee J. Thin Films as an Emerging Platform for Drug Delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;11(5):559–574. DOI: 10.1016/j.ajps.2016.05.004.
6. Villarreal-Gómez L. J., Serrano-Medina A., Torres-Martínez E. J., Perez-González G. L., Cornejo-Bravo J. M. Polymeric advanced delivery systems for antineoplastic drugs: doxorubicin and 5-fluorouracil. *e-Polymers*. 2018;18(4):359–372. DOI: 10.1515/epoly-2017-0202.
7. Salamanca C. H., Barrera-Ocampo A., Lasso J. C., Camacho N., Yarce C. J. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):148. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030148.
8. Melnikova N., Sheferov I., Panteleev D., Emasheva A., Druzhkova I., Ignatova N., Mishchenko T., Vedunova M. Design and Study of Nanoceria Modified by 5-Fluorouracil for Gel and Polymer Dermal Film Preparation. *Pharmaceutics*. 2023;16(8):1082. DOI: 10.3390/ph16081082.

9. Tiozzo Fasiolo L., Manniello M.D., Banella S., Napoli L., Bortolotti F., Quarta E., Colombo P., Balafas E., Kostomit-sopoulos N., Rekkas D.M., Valsami G., Papakyriakopou-lou P., Colombo G., Russo P. Flurbiprofen sodium microparticles and soft pellets for nose-to-brain delivery: Serum and brain levels in rats after nasal insufflation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;605:120827. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120827.
10. Franz S.W. Instrumentation and methodology for in vitro skin diffusion cells. In: Kemppainen B. W., Reifenrath W. G. Methodology for skin absorption. Boca Raton: CRC Press; 1990. P. 35–59.
11. Franz T.J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology*. 1975;64(3):190–195. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12533356.
12. Smith K.L. Penetrant characteristics influencing skin absorption. In: Kemppainen B. W., Reifenrath W. G. Methods for skin absorption. Boca Raton: CRC Press; 1990. P. 24–33.
13. Altun E., Yuca E., Ekren N., Kalaskar D. M., Fikai D., Dolete G., Fikai A., Gunduz O. Kinetic Release Studies of Antibiotic Patches for Local Transdermal Delivery. *Pharmaceutics*. 2021;13(5):613. DOI: 10.3390/pharmaceutics13050613.
14. Adepu S., Ramakrishna S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*. 2021;26(19):5905. DOI: 10.3390/molecules26195905.
15. Trucillo P. Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release. *Processes*. 2022;10(6):1094. DOI: 10.3390/pr10061094.
16. Watkinson A. C., Brain K. R. Basic Mathematical Principles in Skin permeation. In: Walters K. Dermatological and Transdermal Formulations. New York: Marcel Dekker; 2002. P. 61–88.
17. Flynn G. Physicochemical determinants of skin absorption. In: Gerrity T. R., Henry C. J., editors. Principles of route-to-route extrapolation for risk assessment. New York: Elsevier; 1990. P. 93–127.
18. Guy R. H., Hadgraft J. Physicochemical aspects of percutaneous penetration and its enhancement. *Pharmaceutical research*. 1988;5(12):753–758. DOI: 10.1023/a:1015980516564.
19. Förster M., Bolzinger M.-A., Fessi H., Briancçon S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. *European Journal of Dermatology*. 2009;19(4):309–323. DOI: 10.1684/ejd.2009.0676.
20. Tsai W., Tsai H., Wong Y., Hong J., Chang S., Lee M. Preparation and characterization of gellan gum/glucosamine/chitosan film as oral cancer treatment patch. *Materials Science and Engineering: C*. 2018;82:317–322. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.040.
21. Sangster J. M. Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry. Chichester: John Wiley & Sons; 1997. 184 p.
22. Potts R. O., Guy R. H. Predicting skin permeability. *Pharmaceutical research*. 1992;9:663–669. DOI: 10.1023/a:1015810312465.
23. Bronaugh R. L., Barton C. N. Prediction of human percutaneous absorption with physicochemical data. In: Wang R. G. M., Knaak J. B., Maibach H. I. Health Risk Assessment Dermal and Inhalation Exposure and Absorption of Toxicants. Boca Raton: CRC Press; 1993.
24. Dash S., Murthy P. N., Nath L., Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2010;67(3):217–223.
25. Singhvi G., Singh M. In Vitro Drug Release Characterization Models. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011;2(1):77–84.
26. Trucillo P. Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release. *Processes*. 2022;10(6):1094. DOI: 10.3390/pr10061094.
27. Adepu S., Ramakrishna S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*. 2021;26(19):5905. DOI: 10.3390/molecules26195905.
28. Bhasarkar J., Bal D. Kinetic investigation of a controlled drug delivery system based on alginate scaffold with embedded voids. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*. 2019;17(2):2280800018817462. DOI: 10.1177/2280800018817462.
29. Paarakh M., Jose P., Setty C., Christopher J. Release kinetics – concepts and applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*. 2019. DOI: 10.31838/ijprt/08.01.02.
30. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1963;52(12):1145–1149.
31. Nazir S., Khan M. U. A., Al-Arjan W. S., Abd Razak S. I., Javed A., Kadir M. R. A. Nanocomposite hydrogels for melanoma skin cancer care and treatment: In-vitro drug delivery, drug release kinetics and anti-cancer activities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021;14(5):103120. DOI: 10.1016/j.arabjc.2021.103120.
32. Khamizov R. K. A pseudo-second order kinetic equation for sorption processes. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2020;94(1):125–130. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0044453720010148.
33. Plazinski W., Dziuba J., Rudzinski W. Modeling of sorption kinetics: the pseudo-second order equation and the sorbate intraparticle diffusivity. *Adsorption*. 2013;19:1055–1064. DOI: 10.1007/s10450-013-9529-0.
34. Chacin Ruiz E. A., Swindle-Reilly K. E., Ford Versypt A. N. Experimental and mathematical approaches for drug delivery for the treatment of wet age-related macular degeneration. *Journal of Controlled Release*. 2023;363:464–483. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.09.021.
35. Sankavarapu V., Aukunuru J. Development and evaluation of zero order sustained release matrix type transdermal films of ibuprofen. *Journal of Global Pharma Technology*. 2010;2(2):975–8542. DOI: 10.1234/JGPT.V2I2.124.
36. Bao Q., Newman B., Wang Y., Choi S., Burgess D. J. In vitro and ex vivo correlation of drug release from ophthalmic ointments. *Journal of Controlled Release*. 2018;276:93–101. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.03.003.
37. Moore T., Croy S., Mallapragada S., Pandit N. Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic® F127 gel dissolution: drug release in stirred systems. *Journal of Controlled Release*. 2000;67(2–3):191–202. DOI: 10.1016/S0168-3659(00)00215-7.
38. Altun E., Yuca E., Ekren N., Kalaskar D. M., Fikai D., Dolete G., Fikai A., Gunduz O. Kinetic Release Studies of Antibiotic Patches for Local Transdermal Delivery. *Pharmaceutics*. 2021;13(5):613. DOI: 10.3390/pharmaceutics13050613.
39. Chacin Ruiz E. A., Carpenter S. L., Swindle-Reilly K. E., Ford Versypt A. N. Mathematical Modeling of Drug Delivery from Bi-Layered Core-Shell Polymeric Microspheres. *bioRxiv*. 2024. DOI: 10.1101/2024.01.11.575289.
40. Al Sawaftah N., Paul V., Awad N., Hussein G. A. Modeling of Anti-Cancer Drug Release Kinetics From Liposomes and Micelles: A Review. *EEE Transactions on NanoBioscience*. 2021;20(4):565–576. DOI: 10.1109/tnb.2021.3097909.



Исследование субстанции с анизодиаметрической формой кристаллов

Г. В. Трусов^{1, 2✉}, Б. В. Бровченко¹, Ж. М. Козлова², И. И. Краснюк²

¹ Общество с ограниченной ответственностью «АЗТ ФАРМА К.Б.». 123458, Россия, г. Москва, ул. Твардовского, д. 8, стр. 1, Технопарк «СТРОГИНО»

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

✉ Контактное лицо: Трусов Герман Владимирович. E-mail: gtrusov@azt.group

ORCID: Г. В. Трусов – <https://orcid.org/0009-0004-9285-2362>;

Б. В. Бровченко – <https://orcid.org/0009-0005-4904-8253>;

Ж. М. Козлова – <https://orcid.org/0000-0003-1525-732X>;

И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 16.05.2024

Статья принята в печать: 28.06.2024

Статья опубликована: 28.06.2024

Резюме

Введение. В современном мире существует множество фармацевтических субстанций, отличающихся по структуре. При разработке готовых лекарственных форм (ГЛФ) необходимо учитывать множество факторов, таких как физико-химические и технологические свойства субстанций и вспомогательных компонентов, технология производства и др. Данная работа посвящена изучению этих факторов на примере субстанции, имеющей анизодиаметрическую форму кристаллов. Ребамипид был выбран как пример такой субстанции с плохими технологическими характеристиками для исследования и подбора технологии.

Цель. Исследование подходов к изучению субстанции с анизодиаметрической формой кристаллов на примере ребамипида для установления его физико-химических и технологических свойств с целью теоретического обоснования наилучшего способа получения массы для таблетирования.

Материалы и методы. В качестве материалов использовался ребамипид (N-(4-хлорбензоил)-3-(2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)аланин) (экспериментальный образец). В качестве оборудования использовался тестер сыпучести ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Германия), тестер насыпной плотности SVM 122 (ERWEKA GmbH, Германия), вибросито CISA RP 200N (CISA Cedaceria Industrial S.L., Испания), порошковый дифрактометр D8 ADVANCE (Bruker Corporation, США), калориметр DSC 204 F1 (NETZSCH, Германия), электронный микроскоп Hitachi TM-100 (Hitachi, Япония).

Результаты и обсуждение. Была проведена оценка свойств субстанции ребамипида. Исследован полиморфизм субстанции, температура плавления, микроскопия и оценка технологических характеристик субстанции. Применение метода SeDeM позволило определить критические показатели субстанции, которые необходимо скорректировать.

Заключение. При исследовании субстанции ребамипида экспериментальным путем выяснено, что данное вещество обладает полиморфизмом, имеет высокую температуру плавления, иглообразную форму кристаллов, плохую сыпучесть и уплотняемость, что подтверждено применением метода SeDeM.

Ключевые слова: ребамипид, технологические свойства, SeDeM-метод, физико-химические свойства

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

Вклад авторов. Б. В. Бровченко и Г. В. Трусов спланировали и разработали ход экспериментов. Г. В. Трусов проводил экспериментальные работы и анализировал полученные данные. Б. В. Бровченко и Г. В. Трусов участвовали в написании текста статьи. Ж. М. Козлова и И. И. Краснюк принимали участие в рецензировании статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи.

Для цитирования: Трусов Г. В., Бровченко Б. В., Козлова Ж. М., Краснюк И. И. Исследование субстанции с анизодиаметрической формой кристаллов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):66–73. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1826>

Technology criteria for the manufacturing of Rebamipide film-coated tablets

German V. Trusov^{1,2}✉, Bogdan V. Brovchenko¹, Zhanna M. Kozlova², Ivan I. Krasnyuk²

¹ Limited Liability Company "AZT PHARMA K.B.". Technopark "Strogino", 8/1, Tvardovskogo str., Moscow, 123458, Russia

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

✉ **Corresponding author:** German V. Trusov. **E-mail:** gtrusov@azt.group

ORCID: German V. Trusov – <https://orcid.org/0009-0004-9285-2362>;

Bogdan V. Brovchenko – <https://orcid.org/0009-0005-4904-8253>;

Zhanna M. Kozlova – <https://orcid.org/0000-0003-1525-732X>;

Ivan I. Krasnyuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 16.05.2024

Accepted: 28.06.2024

Published: 28.06.2024

Abstract

Introduction. In the modern world, there are many pharmaceutical substances that have various structure. During the development of finished dosage forms (FDPs) it is necessary to take into account many factors, such as physicochemical and technological properties of substances and excipients, manufacturing technology and others. This work is focused on the application of these approaches in practice in relation to a substance with anisodiametric crystal shape. Rebamipide was chosen as an example of such substance with poor technological characteristics for investigation and manufacturing technology selection.

Aim. Research of approaches to examine a substance with anisodiametric crystal shape (Rebamipide in this case) to determine its physicochemical and technological properties in purpose of theoretical substantiation of the best method of manufacturing mass for tableting.

Materials and methods. In this study were used such materials as Rebamipide substance (α -[(4-chlorobenzoyl)amino]-1,2-dihydro-2-oxo-4-quinolinepropanoic acid) (experimental sample). Also were used such equipment as flowability tester ERWEKA GT (Erweka GmbH, Germany), powder density tester ERWEKA SVM 122 (ERWEKA GmbH, Germany), vibrating sieve CISA RP 200N (CISA Cedacera Industrial S.L., Spain), powder diffractometer D8 ADVANCE (Bruker Corporation, USA), calorimeter DSC 204 F1 (NETZSCH, Germany), Hitachi TM-100 electron microscope (Hitachi, Japan).

Results and discussion. The properties of Rebamipide substance were evaluated, such as polymorphism, melting point, microscopy and evaluation of technological characteristics. Application of the SeDeM method allowed to determine the critical parameters of the substance that need to be corrected.

Conclusion. It was found out experimentally that Rebamipide substance has polymorphism, high melting point, needle-shaped crystals, poor bulkiness and compactability, which was confirmed by the use of SeDeM method.

Keywords: rebamipide, technological properties, SeDeM method, physico-chemical properties

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. Bogdan V. Brovchenko and German V. Trusov planned and developed the design of the experiments. German V. Trusov performed experimental work and reviewed the data obtained. Bogdan V. Brovchenko and German V. Trusov participated in the text writing of the article. Zhanna M. Kozlova and Ivan I. Krasnyuk participated in the article reviewing. All authors participated in the discussion of the results and writing of the article.

For citation: Trusov G. V., Brovchenko B. V., Kozlova Z. M., Krasnyuk I. I. Technology criteria for the manufacturing of Rebamipide film-coated tablets. *Drug development & registration*. 2024;13(3):66–73. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1826>

ВВЕДЕНИЕ

Для создания лекарственных препаратов надлежащего качества и определения наиболее подходящей технологии получения готовых лекарственных форм необходимо изучать физико-химические (кристаллическая структура, температура плавления, гигроскопичность и прочее) и технологические (насыпная плотность, фракционный состав, сыпучесть, пористость и прочее) свойства активных фармацевти-

ческих субстанций. Данные свойства помогают определить оптимальные условия производства лекарственных препаратов, подобрать оборудование и выявить критические контрольные точки производственного процесса.

Получивший широкое распространение метод SeDeM (Sediment Delivery Model) используется как один из инструментов для определения возможности применения технологии прямого прессования к

различным фармацевтическим субстанциям, выявления их негативных сторон и недостатков, которые потребуются компенсировать с помощью определенных типов вспомогательных веществ [1]. Несмотря на относительную новизну, данный метод находит широкое применение [2–7], позволяя исследовать вплоть до 12 (или 15 в случае ODT) технологических показателей.

Настоящая работа посвящена определению оптимальной технологии получения ГЛФ на примере ребамипида с анизодиаметрической формой кристаллов. Считается, что наилучшими технологическими характеристиками обладают субстанции с изодиаметрической формой кристаллов (кубические, шаровидные, многогранные и т.д.). Данные порошки хорошо сыплются, обладают малой пористостью, наибольшей площадью поверхности, небольшой уплотняемостью, а также могут быть пригодны для прямого прессования. Кристаллы с анизодиаметрической формой кристаллов (призмы, иглы, пластинки и т.д.), в свою очередь, обладают неудовлетворительными технологическими характеристиками и считаются непригодными в большинстве случаев к прямому прессованию.

Цель работы

Изучить физическо-химические и технологические свойства субстанции, а также исследовать подходы к установлению возможности использования технологии непосредственного прессования с целью получения необходимой лекарственной формы – таблетки, содержащей субстанцию с анизодиаметрическими кристаллами, на примере ребамипида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве изучаемого объекта была выбрана субстанция ребамипида, производное аминокислоты 2-хинолинона, которая используется для защиты слизистой оболочки желудка, заживления гастродуоденальных язв и лечения гастрита¹. Это вещество – белые или почти белые кристаллы, плохо растворяющиеся в воде, растворимые в N,N-диметилформамиде и почти не растворяющиеся в метаноле и этаноле.

В ходе исследования активной фармацевтической субстанции (АФС) ее физико-химические и технологические свойства изучались согласно регламентирующим требованиям Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XV издания:

- ✓ Оценка показателя внешнего вида производилась органолептическим путем на аппарате Hitachi TM-100 (Hitachi, Япония). Процесс осуществлялся с использованием микроскопии (сканирующей электронной).

¹ National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 5042, Rebamipide. Retrieved June 6, 2024. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rebamipide>. Accessed: 16.05.2024.

- ✓ Растворимость изучалась в соответствии с методикой, приведенной в пятнадцатом издании ГФ РФ.
- ✓ Температуру плавления определяли методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью калориметра DSC 204 F1 (NETZSCH, Германия). Небольшое количество (<10 мг) образца помещали при комнатной температуре в стандартный алюминиевый тигель. Запечатанный тигель помещали в ячейку калориметра DSC 204 F1 (NETZSCH, Германия). Эксперименты проводились в температурном интервале от +20 °C до плавления образцов при нагревании со скоростью 3 К/мин в токе Ar (25 мл/мин) высокой чистоты.
- ✓ Структурные характеристики субстанции и таблеток определяли методом рентгеновской дифракции с помощью порошкового дифрактометра D8 ADVANCE (Bruker Corporation, США). Исследование субстанции проводили с использованием дифрактометра Bruker D8 ADVANCE ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). Образец ребамипида помещали в кювету дифрактометра. Дифрактограммы порошков регистрировали в режиме 2 θ -сканирования в интервале от 3 до 42 градусов с шагом 0,02 градуса при температуре +20 °C.
- ✓ Степень сыпучести определяли с помощью прибора ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Германия).
- ✓ Фракционный состав определялся с помощью вибросита CISA RP 200N (CISA Cedaceria Industrial S.L., Испания). Использовались сита с размером ячеек 1,0, 0,5, 0,2 мм и емкость для сбора мелкой фракции.
- ✓ Насыпная масса определялась с помощью прибора ERWEKA SVM 122 (ERWEKA GmbH, Германия).
- ✓ Гигроскопичность определяли в соответствии с ОФС «Гигроскопичность», используя климатическую камеру Binder KBF 115 (BINDER GmbH, Германия).

Исходя из полученных в ходе экспериментальных работ значений истинной и насыпной плотности производили вычисление индекса прессуемости (Карра) и коэффициента Хауснера.

Для преобразования значений в радиусы на диаграмме использовались специальные формулы из таблицы 1 [1].

Чтобы определить по получаемым цифровым значениям, подходит ли субстанция ребамипида для прямого прессования, рассчитывали следующие индексы: (IP) – параметрический индекс; (IPP) – параметрический индекс профиля; (IGC) – индекс хорошей прессуемости [1].

$$IP = \frac{N^{\circ} P \geq 5}{N^{\circ} Pt},$$

где $N^{\circ} P \geq 5$ – суммарное количество параметров, радиус которых больше или равен 5; $N^{\circ} Pt$ – суммарное количество всех параметров, которые изучались в ходе исследования.

Таблица 1. Параметры SeDeM / перевод в радиус

Table 1. Parameters of SeDeM / conversion of values to radius

Параметр Parameter	Обозначение Symbol	Предельное значение (v) Limit value (v)	Радиус (r) Radius (r)	Перевод значения v в радиус r Factor applied to v within radius r
Насыпной объем порошка Bulk density	Da	0–1	0–10	10v
Объем порошка после уплотнения Tapped density	Dc	0–1	0–10	10v
Внутренняя пористость Inter-particle Porosity	Ie	0–1,2	0–10	10v/1,2
Индекс Карра Carr's index	IC	0–50	0–10	v/5
Число Хауснера Hausner's ratio	IH	3–1	0–10	(30–10v)/2
Сыпучесть Flowability	t''	20–0	0–10	10–(v/2)
Гигроскопичность Higroscopicity	%H	20–0	0–10	10–(v/2)
Гомогенность Homogeneity index	Iθ	(0–2) · 10 ⁻²	0–10	500v

$$IPP = \frac{\sum r}{N^{\circ} Pt},$$

где $\sum r$ – обозначение суммы радиусов всех параметров, которые были исследованы.

$$IGC = IPP \cdot f,$$

где f – обозначение фактора надежности, вычисляемого по формуле, приведенной ниже:

$$f = \frac{\text{Площадь многоугольника}}{\text{Площадь окружности}}.$$

В том случае, если мы имеем бесконечное число параметров, то значение такого числа параметров $f=1$, для пятнадцати параметров $f=0,971$, для двенадцати $f=0,952$, а для восьми $f=0,900$.

В случае, если значения параметрического индекса профиля (IPP), индекса хорошей прессуемости (IGC) больше 5,0, а параметрического индекса (IP) больше 0,5, то можно сделать заключение, что субстанция пригодна для прямого прессования.

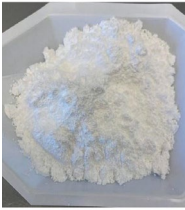
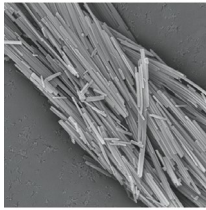
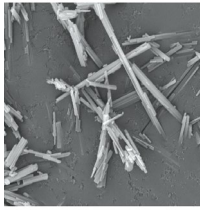
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общеизвестным фактом является то, что физико-механические свойства той или иной субстанции определяются ее микроструктурой, которая, в свою очередь, зависит от химического состава, реологии и метода производства. С помощью метода сканирующей электронной микроскопии можно получить увеличенное в различных диапазонах изображение объектов, их форму и размер.

Ребамипид представляет из себя негигроскопичное вещество (кристаллическое). Его цвет белый или почти белый. При изучении под микроскопом отчетливо видна иглоподобная форма кристаллов. Полученные снимки позволяют сделать вывод, что форма и размеры частиц исследуемой субстанции соответствуют описанной в литературе, коммерчески доступной I форме ребамипида [8]. Было отмечено, что субстанция обладает электростатическими свойствами. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Внешний вид субстанции

Table 2. Substance appearance

Общий вид субстанции Substance overview	Вид субстанции под микроскопом Hitachi при увеличении x4000, масштабный отрезок 20 мкм Substance view under a Hitachi microscope at x4000 magnification, 20 μm scale section	Вид субстанции под микроскопом Hitachi при увеличении x5000, масштабный отрезок 20 мкм Substance view under a Hitachi microscope at x5000 magnification, 20 μm scale section
		

При изучении фракционного состава было отмечено, что субстанция чрезвычайно пористая и занимает большой объем с преобладанием фракции >0,2 мм. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Фракционный состав

Table 3. Sieve test result

Диаметр ячеек сита, мм Sieve mesh diameter, mm	1,0 мм 1,0 mm	0,5 мм 0,5 mm	0,2 мм 0,2 mm	Емкость для сбора мелкой фракции Fine fraction container
Среднее значение содержания частиц, % Average particle content, %	6,33	36,00	50,00	7,67

Как показал литературный поиск, существует 6 полиморфных форм ребамипида:

1. I форма, которая является коммерчески доступной [8].
2. II форма, которую получают перекристаллизацией формы I из метанольно-водного раствора [9].
3. III и IV формы, которые получают разложением сольвата с хлористым метиленом [10].
4. V форма, которую получают разложением моногидрата (субстанция переходит в моногидрат при повышении влажности) [10].
5. Форма А, которую получают нагреванием ребамипида, полученного распылительной сушкой [8].

С целью изучения структурных характеристик субстанции ребамипида использовали рентгенофазовый анализ. Это анализ, сутью которого является установление различных фаз в смеси на основе идентификации дифракционной картины, даваемой изучаемым образцом.

Для установления полиморфной формы субстанции ребамипида изучалась в двух видах:

- 1) в неизмельченном виде;
- 2) в измельченном виде.

Сравнение порошковых дифрактограмм образца субстанции ребамипида неизмельченной и образца субстанции ребамипида после 10 минут тщательного растирания в ступке (рисунок 1) показало, что ребамипид не меняет фазового состояния при растирании. Сравнение порошковых дифрактограмм образцов субстанции ребамипида (рисунок 2) и порошковой дифрактограммы формы I ребамипида, опубликованной в статье [9], показало, что субстанция представляет собой полиморфную форму I ребамипида.

Сравнение полученных данных (рисунки 1, 2) позволяет сделать вывод о том, что исследуемая субстанция ребамипида представлена формой I ребамипида.

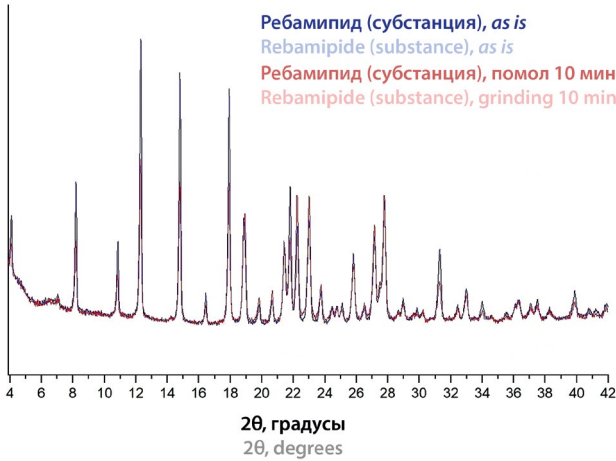


Рисунок 1. Сравнение порошковых дифрактограмм образца субстанции ребамипида неизмельченной и образца субстанции ребамипида после 10 минут тщательного растирания в ступке

Figure 1. Comparison of two samples of powder diffraction patterns: not milled and after 10 minutes milling in mortar

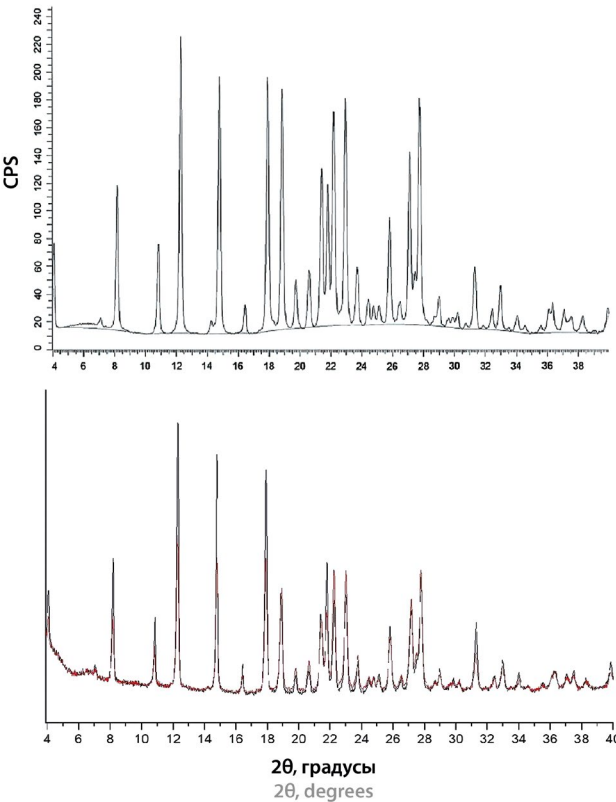


Рисунок 2. Сравнение порошковой дифрактограммы образца субстанции ребамипида (снизу) и порошковой дифрактограммы формы I ребамипида (сверху), опубликованной в статье [9]

Figure 2. Comparison of powder diffraction pattern of a sample of Rebamipide substance (lower) and powder diffraction pattern of form I of Rebamipide (upper) published in the article [9]

Подтверждением полиморфной формы I субстанции ребамипида также является и температура плавления, которая, согласно литературным данным, составляет около 300 градусов [9, 11, 12].

Термический анализ – группа подходов к исследованию физико-химических и химических процессов, происходящих в отдельной субстанции или в имеющих сложный состав смесях при нагревании или охлаждении.

Дифференциальная сканирующая калориметрия – это метод, который основан на постоянном улавливании и регистрации разницы теплового потока образца и эталона как функции температуры.

Температура плавления образцов субстанции ребамипида неизмельченной составила 305 °С (рисунок 3).

Технологические характеристики субстанции определяли в соответствии с требованиями ГФ. Полученные данные представлены в таблице 4.

Микроскопическое исследование показало, что субстанция представлена игольчатыми кристаллами, имеющими в среднем размер 20–30 мкм. Игольчатая форма частиц свидетельствует в пользу неудовлетворительных технологических свойств, что объясняется большой поверхностью контакта и силой когезии. Такие субстанции зачастую легко электризуются, что приводит к трудностям в процессе производства. На плохие технологические свойства указывают такие показатели, как отсутствие сыпучести и низкая уплотняемость.

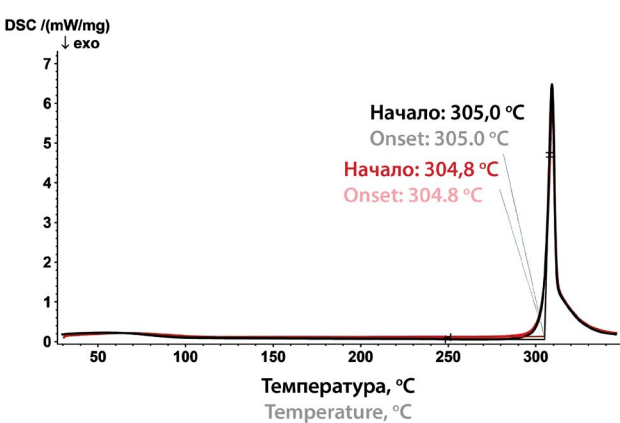


Рисунок 3. Кривая ДСК нагревания образца субстанции ребамипида неизмельченной

Figure 3. DSC heating waveform of a sample of Rebamipide substance not milled

С целью всесторонней оценки технологических свойств субстанции на основании всех полученных данных был проведен SeDeM-анализ.

Результаты расчетов параметров, а также перевод их в радиус круговой диаграммы представлены в таблице 5. Диаграмма показана на рисунке 4.

По итогу проведенных исследований были рассчитаны математические индексы, значения которых составляют:

$IPP = 4,17; IP = 0,38; IGC = 3,75.$

Таблица 4. Технологические характеристики АФС

Table 4. Technological characteristics of APS

	АФС ребамипид
Описание Description	Белый кристаллический порошок White crystalline powder
Растворимость Solubility	Является хорошо растворимым в N,N-диметилформамиде, в то же время очень мало растворимым или же почти нерастворимым непосредственно в метаноле и, кроме того, почти нерастворимым в воде It is highly soluble in N,N-dimethylformamide, but at the same time very slightly soluble or almost insoluble directly in methanol and, in addition, almost insoluble wash in water
Насыпная плотность, г/мл (до уплотнения/после) Bulk and tapped density, g/ml	0,12 ± 0,06 / 0,17 ± 0,08
Сыпучесть (г/с) Flowability (g/s)	Ø 10 – 0 Ø 15 – 0
Индекс Карра Carr's index	1,42 ± 0,07
Число Хауснера Hausner's ratio	29,0 ± 0,92
Гигроскопичность, % Higroscopicity, %	0,69 ± 0,14

Таблица 5. Результаты расчета параметров SeDeM
Table 5. Calculation SeDeM parameters results

Параметр Parameter	Значение (v) Value (v)	Радиус (r) Radius (r)
Насыпной объем порошка (Da) Bulk density (Da)	0,12	1,2
Объем порошка после уплотнения (Dc) Tapped density (Dc)	0,17	1,7
Внутренняя пористость (Ie) Inter-particle Porosity (Ie)	2,45	20,42
Индекс Карра (IC) Carr's index (IC)	29	4,2
Число Хауснера (IH) Hausner's ratio (IH)	1,42	5,3
Сыпучесть (t'') Flowability (t'')	0	0
Гигроскопичность (%H) Higroscopicity (%H)	0,69	9,7
Гомогенность Homogeneity index (Iθ)	0,00227	1,14

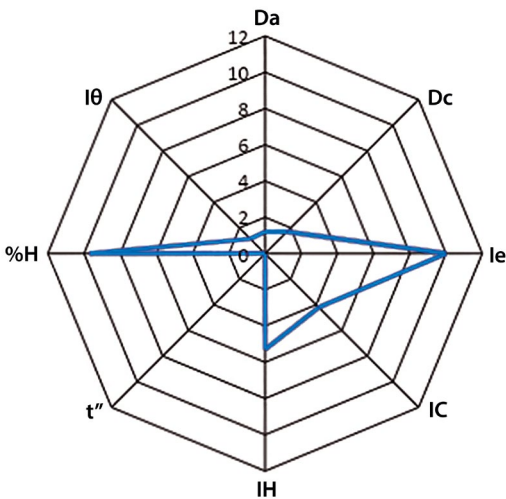


Рисунок 4. Диаграмма SeDeM
Figure 4. SeDeM diagram

Индексы показывают, что данное вещество не подходит для прямого прессования и для улучшения его характеристик необходимо использование большого количества определенных типов вспомогательных веществ:

- 1) наполнителей (к примеру, микрокристаллическая целлюлоза марки 102, которая обладает хорошей уплотняемостью и сыпучестью, а также зачастую применяется при прямом прессовании);
- 2) связующих (к примеру, крахмал прежелатинизированный, который обладает хорошими связывающими свойствами, а также отлично сыплется);

3) глидантов (к примеру, кремния диоксид коллоидный, который благодаря небольшому размеру частиц и большой площади поверхности может значительно повысить сыпучесть массы).

Данные классы веществ помогут улучшить гомогенность смеси, уплотняемость и, соответственно, ее сыпучесть. Улучшение данных параметров позволит избежать проблем при таблетировании (нарушение однородности дозирования, трудности с формированием ядра, низкая прочность готового продукта).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была изучена используемая для разработки ГЛФ субстанция ребамипида. Установлена ее полиморфная форма I (с клинически доказанной эффективностью [10]), изучена кристаллическая структура (кристаллы имеют игольчатую структуру), температура плавления, а также получена картина рентгенофазного анализа, что соотносится с литературными данными.

В ходе исследований было установлено, что субстанция ребамипида обладает крайне низкими технологическими свойствами, и подтверждено при помощи метода SeDeM, что для создания лекарственной формы «таблетки», которую можно получить методом прямого прессования, необходимо большое количество вспомогательных веществ, а этократно увеличивает массу готовой лекарственной формы, что противоречит принципам бережливого производства. В свою очередь, физико-химические показатели, такие как температура плавления и гигроскопичность, указывают на то, что получение готовой лекарственной формы возможно методами как сухой, так и влажной грануляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pérez P., Suñé-Negre J. M., Miñarro M., Roig M., Fuster R., García-Montoya E., Hernández C., Ruhí R., Tico J. R. A new expert systems (SeDeM diagram) for control batch powder formulation and preformulation drug products. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;64(3):351–359. DOI: 10.1016/j.ejpb.2006.06.008.
2. Коцур Ю. М., Ладутко Ю. М., Наркевич И. А., Флисюк Е. В. Прогнозирование состава таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия с применением метода SeDeM. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):54–62. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62.
3. Тишков С. В., Блынская Е. В., Алексеев К. В., Буюева В. В. Использование метода SeDeM-ODT для разработки таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта. *Российский биотерапевтический журнал*. 2021;20(3):34–46. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-34-46.
4. Sipos E., Oltean A. R., Szabó Z.-I., Rédei E.-M., Nagy G. D. Application of SeDeM expert systems in preformulation studies of pediatric ibuprofen ODT tablets. *Acta Pharmaceutica*. 2017;67(2):237–246. DOI: 10.1515/acph-2017-0017.

5. Trisopon K., Kittipongpatana N., Wattanaarsakit P., Kittipongpatana O. S. Formulation Study of a Co-Processed, Rice Starch-Based, All-in-One Excipient for Direct Compression Using the SeDeM-ODT Expert System. *Pharmaceuticals*. 2021;14(10):1047. DOI: 10.3390/ph14101047.
6. Hamman H., Hamman J., Wessels A., Scholtz J., Steenekamp J. H. Development of multiple-unit pellet system tablets by employing the SeDeM expert diagram system I: pellets with different sizes. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2018;23(7):706–714. DOI: 10.1080/10837450.2017.1342657.
7. Zieschang L., Klein M., Jung N., Krämer J., Windbergs M. Formulation development of medicated chewing gum tablets by direct compression using the SeDeM-Diagram-Expert-System. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;144:68–78. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.09.003.
8. Xiong X., Xu K., Li S., Tang P., Xiao Y., & Li H. Solid-state amorphization of rebamipide and investigation on solubility and stability of the amorphous form. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43(2):283–292. DOI: 10.1080/03639045.2016.1239627.
9. Jeon S. H., Sohn Y. T. The solid state of rebamipide: Preparation, characterization, and dissolution. *Archives of Pharmacal Research*. 2016;39(4):508–515. DOI: 10.1007/s12272-016-0723-y.
10. Xiong X., Du Q., Zeng X., He J., Yang H., Li H. Solvates and polymorphs of rebamipide: preparation, characterization, and physicochemical analysis. *RSC Advances*. 2017;7(38):23279–23286. DOI: 10.1039/C7RA02895D.
11. Park C.-W., Tung N.-T., Rhee Y.-S., Kim J.-Y., Oh T.-O., Ha J.-M., Chi S.-C., Park E.-S. Physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluations of novel ternary solid dispersion of rebamipide with poloxamer 407. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013;39(6):836–844. DOI: 10.3109/03639045.2012.674138.
12. Guo Y., Wang Y., Xu L. Enhanced bioavailability of rebamipide nanocrystal tablets: Formulation and in vitro/in vivo evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;10(3):223–229. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.09.006.
5. Trisopon K., Kittipongpatana N., Wattanaarsakit P., Kittipongpatana O. S. Formulation Study of a Co-Processed, Rice Starch-Based, All-in-One Excipient for Direct Compression Using the SeDeM-ODT Expert System. *Pharmaceuticals*. 2021;14(10):1047. DOI: 10.3390/ph14101047.
6. Hamman H., Hamman J., Wessels A., Scholtz J., Steenekamp J. H. Development of multiple-unit pellet system tablets by employing the SeDeM expert diagram system I: pellets with different sizes. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2018;23(7):706–714. DOI: 10.1080/10837450.2017.1342657.
7. Zieschang L., Klein M., Jung N., Krämer J., Windbergs M. Formulation development of medicated chewing gum tablets by direct compression using the SeDeM-Diagram-Expert-System. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;144:68–78. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.09.003.
8. Xiong X., Xu K., Li S., Tang P., Xiao Y., & Li H. Solid-state amorphization of rebamipide and investigation on solubility and stability of the amorphous form. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43(2):283–292. DOI: 10.1080/03639045.2016.1239627.
9. Jeon S. H., Sohn Y. T. The solid state of rebamipide: Preparation, characterization, and dissolution. *Archives of Pharmacal Research*. 2016;39(4):508–515. DOI: 10.1007/s12272-016-0723-y.
10. Xiong X., Du Q., Zeng X., He J., Yang H., Li H. Solvates and polymorphs of rebamipide: preparation, characterization, and physicochemical analysis. *RSC Advances*. 2017;7(38):23279–23286. DOI: 10.1039/C7RA02895D.
11. Park C.-W., Tung N.-T., Rhee Y.-S., Kim J.-Y., Oh T.-O., Ha J.-M., Chi S.-C., Park E.-S. Physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluations of novel ternary solid dispersion of rebamipide with poloxamer 407. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013;39(6):836–844. DOI: 10.3109/03639045.2012.674138.
12. Guo Y., Wang Y., Xu L. Enhanced bioavailability of rebamipide nanocrystal tablets: Formulation and in vitro/in vivo evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;10(3):223–229. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.09.006.

REFERENCES

1. Pérez P., Suñé-Negre J. M., Miñarro M., Roig M., Fuster R., García-Montoya E., Hernández C., Ruhí R., Ticó J. R. A new expert systems (SeDeM diagram) for control batch powder formulation and preformulation drug products. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;64(3):351–359. DOI: 10.1016/j.ejpb.2006.06.008.
2. Kotsur J. M., Ladytko J. M., Narkevich I. A., Flisyuk E. V. Prediction of the composition of prolonged release tablets based on 4,4'-(propandiamido) sodium dibenzoate using the SeDeM method. *Drug development & registration*. 2021;10(4):54–62. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62.
3. Tishkov S. V., Blynskaya E. V., Alekseev K. V., Buyeva V. V. Using the sedem-odt method for the development of gk-2 tablets dispersed in the oral cavity. *Russian Journal of Biotherapy*. 2021;20(3):34–46. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-34-46.
4. Sipos E., Oltean A. R., Szabó Z.-I., Rédei E.-M., Nagy G. D. Application of SeDeM expert systems in preformulation studies of pediatric ibuprofen ODT tablets. *Acta Pharmaceutica*. 2017;67(2):237–246. DOI: 10.1515/acph-2017-0017.

РЕКЛАМА

7–8 ОКТЯБРЯ 2024 | «ГЕЛЕНДЖИК АРЕНА»



БИОТЕХМЕД

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ
ИННОВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ФАРМАЦЕВТИКЕ И МЕДИЦИНЕ

ОТРАСЛЕВОЙ ФОКУС



Медицинские изделия
и оборудование



Фармацевтическая
промышленность



Реабилитация



IT в медицине



Биологически
активные добавки

ТЕМАТИКИ ФОРУМА



Регуляторная
политика



Нацпроекты
и стратегии развития



Кадровый потенциал



Взаимодействие
науки и бизнеса



Сырье и материалы



Пациентские сообщества



Приглашаем принять участие!
Подробнее на сайте проекта
[BIOTECHMEDCONF.RU](https://biotechmedconf.ru)

16+

ОРГАНИЗАТОР

business event
группа компаний **FORMIKA**

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ



**Минпромторг
России**

ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫЙ ПАРТНЁР

S · GROUP
ЦЕНТР КОРПОРАТИВНЫХ КОММУНИКАЦИЙ



Разработка технологии получения медицинской терапевтической биodeградируемой системы в виде полимерных микроигл для доставки белковых препаратов

М. С. Золотарева¹✉, В. В. Чуриков¹, А. В. Панов¹, С. А. Кедик^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ МИРЭА). 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

² Акционерное общество «Институт фармацевтических технологий» (АО «ИФТ»), 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, офис 1

✉ Контактное лицо: Золотарева Мария Сергеевна. E-mail: mariya.zolotareva2014@yandex.ru

ORCID: М. С. Золотарева – <https://orcid.org/0000-0002-1597-6992>;

В. В. Чуриков – <https://orcid.org/0000-0003-4095-8363>;

А. В. Панов – <https://orcid.org/0000-0002-1603-143X>;

С. А. Кедик – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>.

Статья поступила: 16.07.2024

Статья принята в печать: 06.08.2024

Статья опубликована: 07.08.2024

Резюме

Введение. Растворяющиеся полимерные микроиглы являются перспективной системой доставки лекарственных препаратов, в частности вакцин. Однако до сих пор существуют проблемы при разработке оптимальной масштабируемой технологии их изготовления.

Цель. Разработать масштабируемую технологию изготовления полимерных растворяющихся микроигл, которая позволит максимально сохранить белковые препараты в производственном процессе.

Материалы и методы. Для изготовления микроигл использовался метод отлива из растворителя в мастер-формы из полиэтилентерефталата со сквозными микрополостями конической формы. В качестве материала микроигл использовался водный раствор, содержащий 20 % масс. об. пуллулана и 3 % масс. об. поливинилового спирта. В качестве модельного белка использовался препарат человеческого сывороточного альбумина.

Результаты и обсуждение. В ходе работы были подобраны оптимальные режимы заполнения мастер-формы и сушки микроигл, позволяющие максимально сохранить белковый препарат в составе микроигл в процессе производства.

Заключение. Разработанная технология изготовления полимерных растворяющихся микроигл может быть масштабирована, так как не содержит лимитирующих стадий производства, и использоваться для производства систем доставки вакцин.

Ключевые слова: полимерные микроиглы, растворяющиеся микроиглы, пластырь с микроиглами, система доставки, белковые препараты, технология получения, человеческий сывороточный альбумин

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

Вклад авторов. М. С. Золотарева составила план эксперимента и вместе с В. В. Чуриковым провела эксперименты. С. А. Кедик, А. В. Панов, В. В. Чуриков, М. С. Золотарева принимали участие в обсуждении и анализе полученных результатов. Все авторы участвовали в обсуждении и интерпретации полученных результатов, а также написании текста статьи.

Для цитирования: Золотарева М. С., Чуриков В. В., Панов А. В., Кедик С. А. Разработка технологии получения медицинской терапевтической биodeградируемой системы в виде полимерных микроигл для доставки белковых препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):75–84. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1877>

Design of scalable manufacturing process for the production of biodegradable polymeric microneedles for protein transdermal drug delivery

Mariia S. Zolotareva¹✉, Vladislav V. Churikov¹, Aleksey V. Panov¹, Stanislav A. Kedik^{1, 2}

¹ MIREA – Russian Technological University. 86, prospekt Vernadskogo, Moscow, 119571, Russia

² Joint Stock Company "Institute of Pharmaceutical Technologies". 21/1, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

✉ Corresponding author: Mariia S. Zolotareva. E-mail: mariya.zolotareva2014@yandex.ru

© Золотарева М. С., Чуриков В. В., Панов А. В., Кедик С. А., 2024

© Zolotareva M. S., Churikov V. V., Panov A. V., Kedik S. A., 2024

ORCID: Mariia S. Zolotareva – <https://orcid.org/0000-0002-1597-6992>;
Vladislav V. Churikov – <https://orcid.org/0000-0003-4095-8363>;
Aleksey V. Panov – <https://orcid.org/0000-0002-1603-143X>;
Stanislav A. Kedik – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>.

Received: 16.07.2024

Accepted: 06.08.2024

Published: 07.08.2024

Abstract

Introduction. Dissolving polymeric microneedles are attractive drug delivery system especially for vaccine delivery. Still there are a lot of obstacles in developing scalable manufacturing process of them.

Aim. To develop a scalable manufacturing process for producing polymeric dissolving microneedles, which can enable keeping protein activity during manufacturing process.

Materials and methods. Microneedles were produced from aqua solution of 20 % w.v. pullulan and 3 % w.v. polyvinyl alcohol by casting in hollow negative polyethylene terephthalate mold. Human serum albumin was chosen as a model protein for this investigation.

Results and discussion. There were chosen the mode of mold filling and microneedle drying process, which can guarantee keeping of protein activity during manufacturing process.

Conclusion. The designed technology can be easily scaled up and used for producing vaccine drug delivery systems, because it doesn't contain any restraining processes.

Keywords: polymeric microneedles, dissolving microneedles, microneedle patch, drug delivery, protein delivery, manufacturing process, human serum albumin

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. Mariia S. Zolotareva drew up an experiment plan. Mariia S. Zolotareva and Vladislav V. Churikov conducted an experiment. Stanislav A. Kedik, Aleksey V. Panov, Vladislav V. Churikov, Mariia S. Zolotareva took part in the discussion and analysis of the results. All authors took part in the discussion and analysis of the results. in writing and reviewing the text of the article.

For citation: Zolotareva M.S., Churikov V.V., Panov A.V., Kedik S.A. Design of scalable manufacturing process for the production of biodegradable polymeric microneedles for protein transdermal drug delivery. *Drug development & registration*. 2024;13(3):75–84. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1877>

ВВЕДЕНИЕ

Микроиглы чаще всего представляют собой выполненные из различных материалов конусы или пирамиды с шириной основания от 50 до 300 мкм и высотой от 500 до 900 мкм [1]. Использование микроигл в составе медицинских терапевтических систем позволяет преодолеть естественный барьер трансдермальных лекарственных форм – роговой слой кожи, а также осуществить безболезненную доставку препаратов за счет небольшой длины микроигл [2]. Использование в качестве материала для изготовления микроигл разрешенных для фармацевтической отрасли биodeградируемых полимеров позволяет не только уйти от образования эпидемиологически опасных острых отходов класса Б, но и стабилизировать белковые препараты, например вакцины, в полимерной матрице микроигл при хранении вне условий холодовой цепи [3–5].

Одной из основных проблем при производстве растворяющихся полимерных микроигл является проблема масштабирования процесса их изготовления. Традиционно такие микроиглы изготавливают методом отлива из растворителя в мастер-форму из полидиметилсилоксана: для заполнения микрополостей такого гидрофобного материала приходится использовать вакуумные камеры и центрифугирование в процессе высушивания, что затрудняет процесс масштабирования [6]. Помимо этого, трудоемким является и процесс изготовления самих мастер-форм. Небольшим улучшением данной ситуации стала разработка мастер-форм со сквозными микрополостями, которые заполняются при подаче вакуума с нижней стороны формы, однако это не решило проблему масштабирования процесса получения микроигл [7].

В данной работе для изготовления микроигл использовали мастер-формы, изготовленные из более гидрофильного и коммерчески доступного материала – полиэтилентерефталата (ПЭТФ), полученные легко масштабируемым и воспроизводимым методом лазерного прошивания [8]. Целью данной работы было разработать масштабируемую технологию изготовления полимерных растворяющихся микроигл, которая позволит максимально сохранить белковые препараты в производственном процессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом исследования являлись растворяющиеся полимерные микроиглы из пуллулана и поливинилового спирта. В работе использовали: пуллулан (200 кДа, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., cosmetic grade), поливиниловый спирт (ПВС) (BF-08, среднечисленная молекулярная масса 40 кДа, степень гидролиза более 98 %, Rasean LTD., Ph. Eur.), воду очищенную (ФС.2.2.0020), калия дигидрофосфат, династрия гидрофосфат, натрия хлорид (х.ч., ООО ТД «ХИМ-МЕД», Россия), хлористоводородную кислоту 0,1 М (ТУ 2642-001-56278322-2008, ООО «Русхим.ру», Россия). В качестве модельного белка для разработки технологии использовался препарат человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) (АО «НПО «Микроген», Россия. Сывороточный альбумин крови человека, раствор для инфузий 20 %).

Приготовление состава для изготовления микроигл

Сначала готовили 3 % масс. об. раствор ПВС в воде очищенной при нагревании при 60 °С и скорости перемешивания 1500 об/мин. Затем раствор охлаждали до 30 °С и в него постепенно вводили навеску пуллулана для получения 20 % масс. об. раствора при перемешивании со скоростью 1500 об/мин. Затем полученный состав дегазировали в вакуумной камере и использовали для заполнения мастер-форм. Для получения микроигл с ЧСА в состав раствора дополнительно вводили препарат ЧСА при 25 °С и скорости перемешивания 750 об/мин.

Определение динамической вязкости состава

Измерение проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.0015 «Вязкость» Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XV издания. Измерение значений динамической вязкости в диапазоне температур 25–50 °С проводили методом ротационной вискозиметрии с помощью вискозиметра Брукфильда DV2T (Brookfield Engineering Laboratories Inc., США), снабженного термостатируемой измерительной ячейкой типа коаксиальных цилиндров с использованием адаптера для малых образцов и шпинделем SC4-16, который имел следующие геометрические параметры: диаметр – 6,99 мм, высоту – 20,7 мм. Исследу-

емый образец объемом 5 мл помещали в измерительную ячейку и термостатировали в течение 20 мин. Измерения проводились в диапазоне скоростей сдвига от 0,28 до 58,0 с⁻¹, которые соответствовали крутящему моменту 10–90 %.

Получение микроигл

Растворяющиеся полимерные микроиглы изготавливали методом отлива в мастер-формы из ПЭТФ со сквозными микрополостями [8] (рисунок 1). Для этого 170 мкл полученного состава наносили на мастер-форму со стороны входных отверстий большего диаметра, а к выходным отверстиям меньшего диаметра подавали вакуум (не менее 0,02 МПа). После появления каплей состава со стороны выходных отверстий подачу вакуума прекращали, снимали излишки состава с помощью лезвия и высушивали. Для разработки технологии варьировали время заполнения мастер-форм, температуру и продолжительность режимов высушивания состава в мастер-формах.

Оптическая микроскопия

Оценку геометрии микроигл проводили методом оптической микроскопии в соответствии с ОФС.1.2.1.0009 «Оптическая микроскопия» ГФ РФ XV на микроскопе бинокулярном XSP-107E (ApexLab) с цифровой камерой TourCam UCMOS14000KPA. Для этого образец массива микроигл помещали на предметный столик, зафиксировав так, чтобы микроиглы находились перпендикулярно световому лучу. Размеры микроигл обсчитывали в программе TourView.

Оценка остаточного содержания влаги в микроиглах

Остаточное содержание влаги в образцах микроигл проводили методом потери в массе при высушивании в соответствии с ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» ГФ РФ XV. Для этого образец микроигл помещали в предварительно взвешенный бюкс, высушивали в нем с открытой крышкой в течение 2 ч в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С. Затем открытый бюкс вместе с крышкой помещали в эксикатор для охлаждения на 50 мин, после чего закрывали крышкой и взвешивали.

Спектрофотометрия образцов

Оценку содержания белка в образцах и индекса агрегации ЧСА проводили по результатам спектрофотометрии в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» ГФ РФ XV. Для проведения анализа образец микроигл растворяли в 2 мл буферного раствора pH 7,4 (ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы» ГФ РФ XV), затем доводили объем раствора до 10 мл в мерной пробирке и проводили спектрофотометрию в диапазоне длин волн 190–400 нм, фиксируя величину поглощения раствора при 278 нм и 350 нм

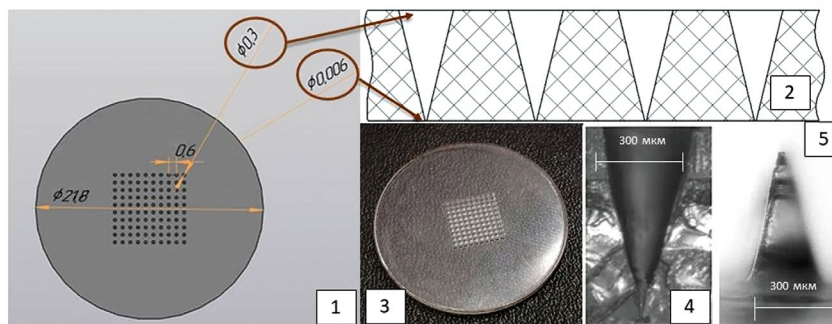


Рисунок 1. Визуализация внешнего вида МФ:

1 – вид сверху; 2 – разрез; 3 – фото образца МФ из ПЭТФ; 4 – фото разреза микрополости; 5 – фото микроиглы, полученной с ее использованием

Picture 1. The visualization of mold appearance:

1 – top view; 2 – sectional; 3 – photo of PETF-mold; 4 – of mold's microcavity sectional view; 5 – photo of microneedle made in it

(длина оптического пути – 1 см, базовая линия – буферный раствор pH 7,4).

Количественное содержание ЧСА в микроиглах определяли с использованием градуировочного графика по формуле 1.

$$m_{\text{ЧСА}} = \frac{D_{278}}{0,4808} \cdot 10, \quad (1)$$

где m – содержание ЧСА в РМИ, мг; D_{278} – поглощение раствора при 278 нм; 10 – объем растворения, мл.

Индекс агрегации ЧСА рассчитывали по формуле 2 [9]:

$$IA = \frac{D_{350}}{(D_{278} - D_{350})} \cdot 100, \quad (2)$$

где IA – индекс агрегации ЧСА; D_{350} – величина поглощения раствора ЧСА при 350 нм; D_{278} – величина поглощения раствора ЧСА при 278 нм.

Для расчета удельного поглощения и удельного индекса агрегации ЧСА величину поглощения раствора при 278 нм и индекс агрегации ЧСА в составе микроигл соответственно делили на массу микроигл.

Статистический анализ данных проводили в программе Microsoft Excel. Количественные данные в случае нормального распределения представлены в виде

$$M \pm \sigma,$$

где M – среднее значение, σ – стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании литературных данных для изготовления микроигл были выбраны следующие параметры, обеспечивающие необходимую глубину введе-

ния и прочность [1–7]: форма – коническая, высота – 600–700 мкм, диаметр основания – 300 мкм, расстояние между вершинами микроигл – 600 мкм, количество микроигл в массиве – 100 шт (10 × 10). При разработке технологии получения полимерных растворяющихся микроигл с человеческим сывороточным альбумином в качестве модельного белка учитывали такие факторы, как вязкость полимерного состава, режим заполнения мастер-формы, режим высушивания микроигл в форме (рисунок 2).

При разработке технологии получения полимерных микроигл для обеспечения эффективного заполнения мастер-форм со сквозными коническими микрополостями необходим выбор оптимальной температуры полимерного состава для облегчения процесса заполнения. Для этого при разных температурах определяли динамическую вязкость выбранного состава, который при комнатной температуре представляет собой вязкую жидкость (рисунок 3). Для данного состава наблюдается неньютоновское поведение: вязкость растворов очень медленно снижается с ростом скорости сдвига. Однако с ростом температуры динамическая вязкость раствора начинает снижаться и при температурах 45 и 50 °C практически перестает зависеть от скорости сдвига – наблюдается ньютоновское поведение. Таким образом, для облегчения заполнения микрополостей формы полимерным раствором его можно нагревать до температуры 45 °C в случае, если состав не содержит белковых компонентов. Для белковых составов рекомендуется использовать краткое нагревание до температуры не более 3 °C: это облегчит процесс заполнения и в то же время позволит сохранить активность белковых компонентов. Контроль полноты заполнения форм при данных температурах подтвердил 100 % заполнение микрополостей и получение воспроизводимых массивов микроигл, что в дальнейшем гарантирует однородность

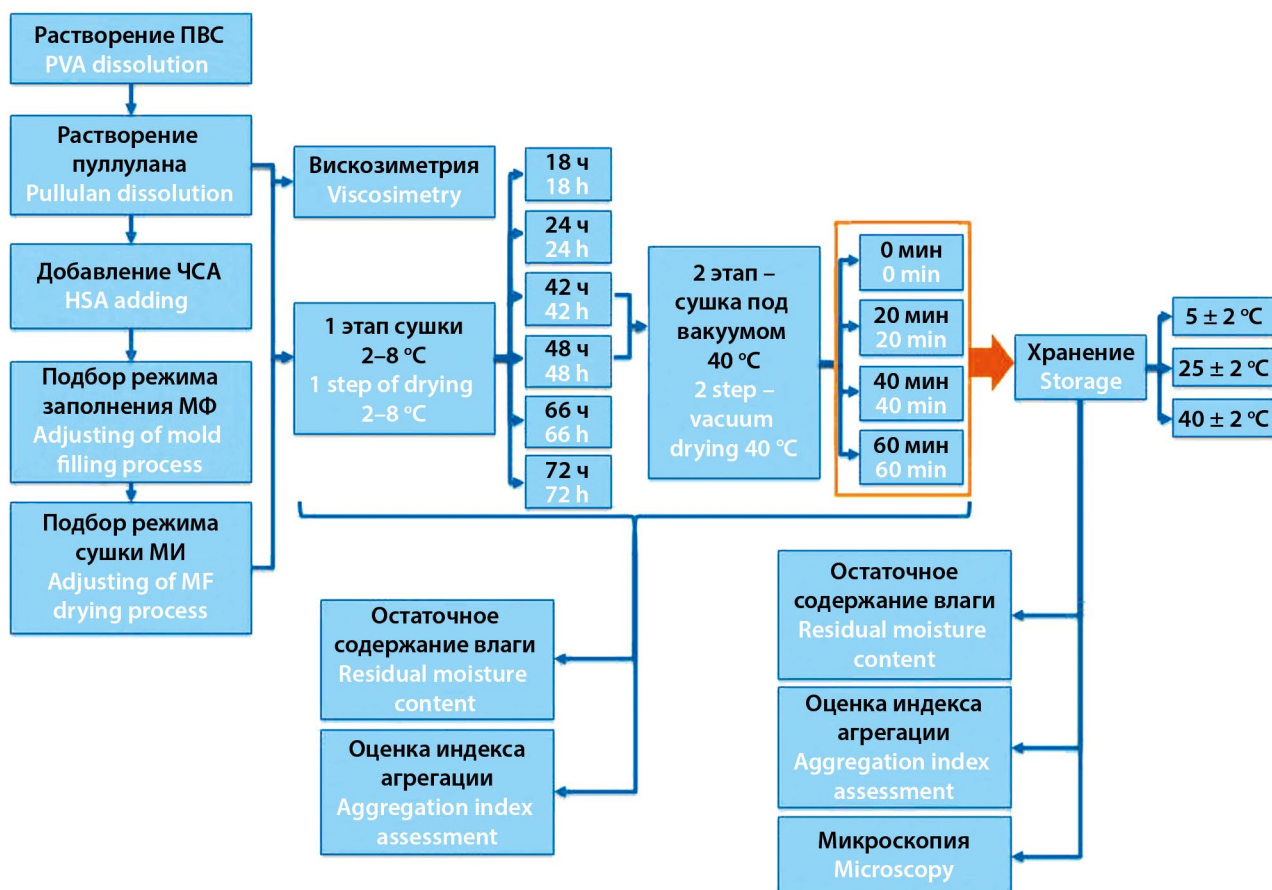


Рисунок 2. Блок-схема экспериментов по разработке технологии получения полимерных растворяющихся микроигл с белковым препаратом

Picture 2. Design of experiments for developing polymeric dissolving microneedle's manufacture process

дозирования фармацевтической субстанции в данной системе доставки и обеспечивает 100 % проникновение растворяющихся микроигл через роговой слой кожи.

Далее необходимо было подобрать оптимальное время заполнения микрополостей форм составом при температуре, подходящей для белковых препаратов, – 35 °C: важно подобрать такую продолжительность процесса, чтобы все микрополости успели полностью заполниться, но при этом не происходило полного вытекания состава через них, так как это приводит к образованию пустот при высыхании состава и неполному формированию массива микроигл. По результатам микроскопии образцов микроигл, полученных при разной продолжительности заполнения мастер-форм составом, в качестве оптимального выбран промежуток 20 с (рисунок 4).

Затем необходимо было подобрать продолжительность и температурный режим сушки полимерных составов внутри заполненных мастер-форм. Для того чтобы исключить вспенивание состава внутри мастер-форм и максимально сохранить структуру белка в готовом продукте, по результатам экспериментов предложен режим, в котором на 1 этапе

заполненные формы высушивают при температуре 5 ± 2 °C, а затем проводят досушивание в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °C. На первом шаге в процессе разработки варьировали продолжительность 1 этапа от 18 до 72 ч, при этом 2 этап либо отсутствовал (X), либо занимал 60 мин (T) (рисунки 2, 5, 6). Для оценки стабильности белка в процессе изготовления контролировали величину удельного значения поглощения ЧСА при растворении микроигл в буферном растворе pH 7,4 при 278 нм, а контроль степени высушивания проводился по оценке остаточного содержания влаги в микроиглах. Также оценивали остаточное содержание влаги в микроиглах без ЧСА (П).

На основании полученных данных оптимальной продолжительностью высушивания при 5 ± 2 °C для микроигл с ЧСА можно считать 48 ч; стоит отметить, что в этом случае досушивание микроигл в вакуумном шкафу не вносит сильного вклада: остаточное содержание влаги остается примерно на одном уровне, так же как и удельное поглощение растворов при 278 нм, что говорит о возможном сохранении структуры белка в процессе изготовления. При необходимости можно сократить про-

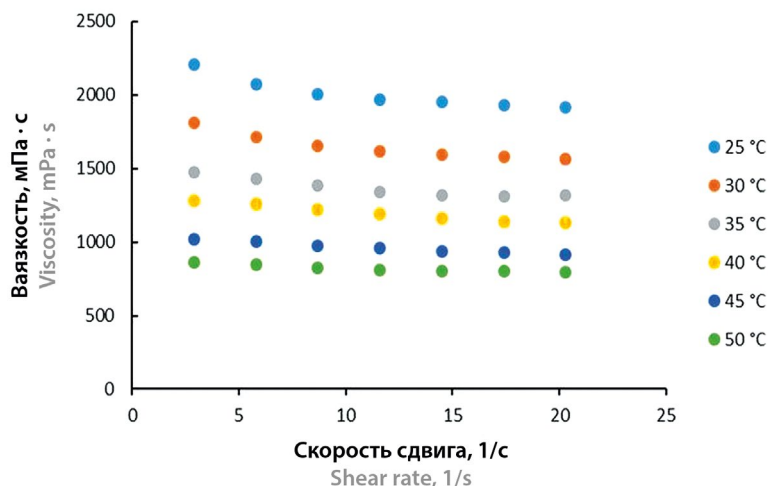


Рисунок 3. Зависимость динамической вязкости состава для изготовления микроигл (20 % пуллулана, 3 % ПВС) от скорости сдвига и температуры

Picture 3. Dependence of the dynamic viscosity of the microneedle solution (20 % w.v. pullulan and 3 % w.v. PVA) on shear rate at different temperatures

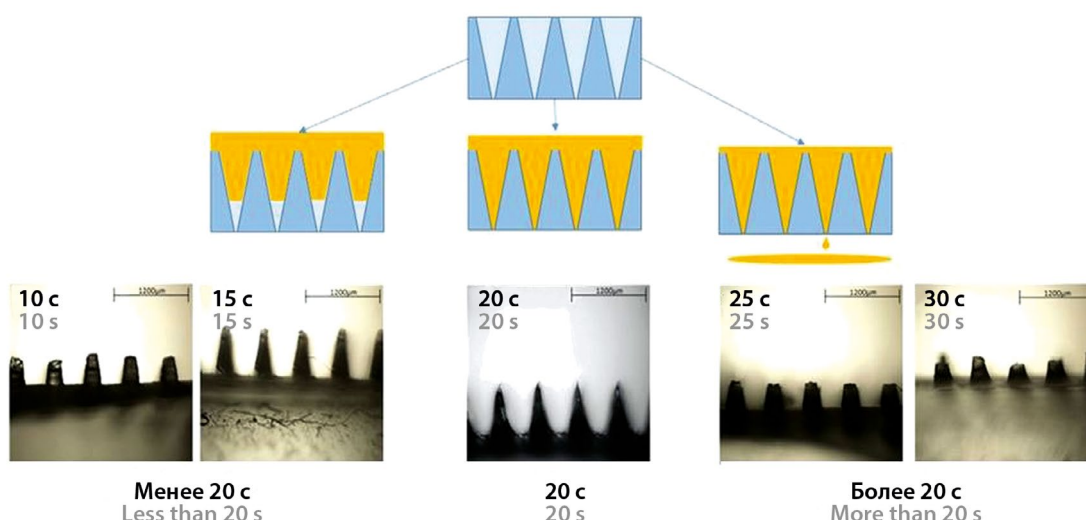


Рисунок 4. Фото микроигл, полученных при разной продолжительности заполнения мастер-форм

Picture 4. Photos of microneedles made by using different duration of mold filling

должительность первого этапа сушки с 48 до 42 ч с добавлением этапа досушивания в вакуумном шкафу при 40 °C в течение 1 ч – при этом наблюдается лишь незначительное увеличение удельного поглощения раствора при сохранении остаточного содержания влаги на том же уровне, что и при высушивании на 1 этапе в течение 48 ч.

Параллельно для режима с высушиванием на 1 этапе в течение 48 ч варьировали время досушивания в вакуумном сушильном шкафу от 20 до 60 мин (рисунок 7). Оценка остаточного содержания влаги после каждого из этапов показывает, что минимальное содержание влаги в готовом продукте и мак-

симальное удаление влаги на 2 этапе достигается при высушивании в вакуумном сушильном шкафу в течение минимум 40 мин. Помимо этого, образцы микроигл, полученные при разных режимах досушивания в вакуумном сушильном шкафу, были заложены на хранение при комнатной температуре, чтобы оценить, как остаточное содержание влаги и температурный режим могут повлиять на стабильность белка в процессе хранения. Для этого определяли удельное значение поглощения раствора микроигл при 278 нм после их хранения в течение 2, 5 и 9 месяцев, а также рассчитывали удельный индекс

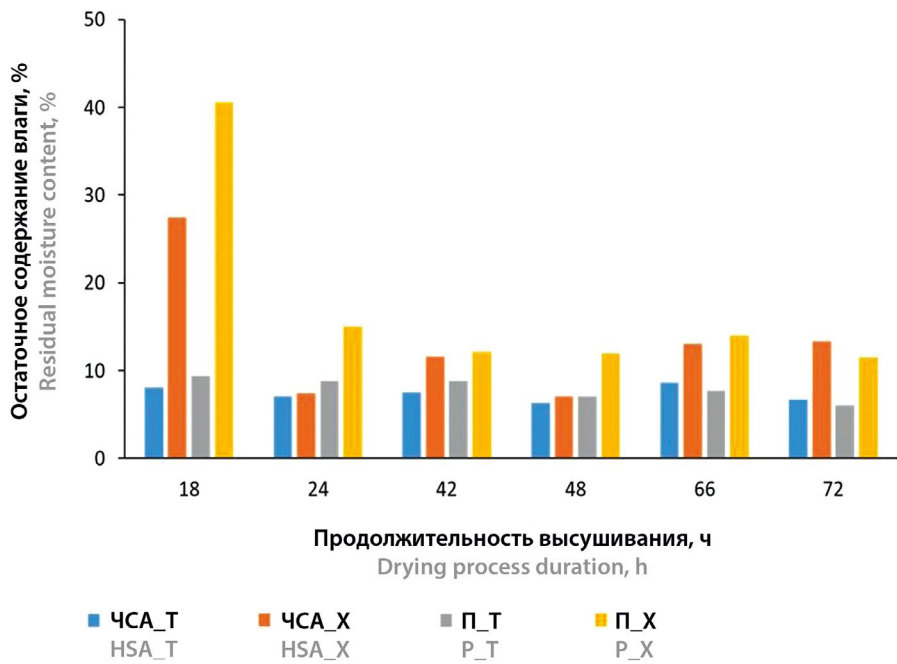


Рисунок 5. Зависимость остаточного содержания влаги в микроиглах от режима [с использованием вакуумного шкафа (Т) и без (Х)] и продолжительности высушивания при $5 \pm 2^\circ\text{C}$

Picture 5. Dependence of residual moisture in microneedles on mode [with (T) or without (X) vacuum drying] and duration of drying under $5 \pm 2^\circ\text{C}$

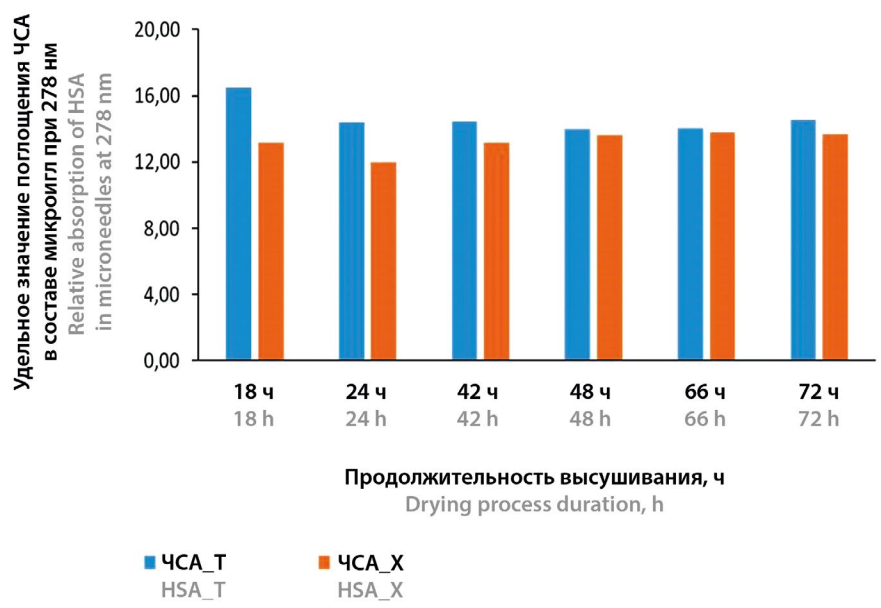


Рисунок 6. Зависимость удельного значения поглощения ЧСА в составе микроигл при 278 нм от режима [с использованием вакуумного шкафа (Т) и без (Х)] и продолжительности высушивания при $5 \pm 2^\circ\text{C}$

Picture 6. Dependence of relative absorption of HSA in microneedles (278 nm) on mode [with (T) or without (X) vacuum drying] and duration of drying under $5 \pm 2^\circ\text{C}$

агрегации (ИА) (рисунок 8). Результаты анализов не показали статистически значимой разницы в значениях удельного поглощения для образцов каждого из режимов в течение всего срока хранения, но на-

блюдается разница в удельных ИА. Наилучшая стабилизация ЧСА (минимальный ИА) наблюдается при досушивании микроигл на 2 этапе в вакуумном сушильном шкафу в течение 60 мин.

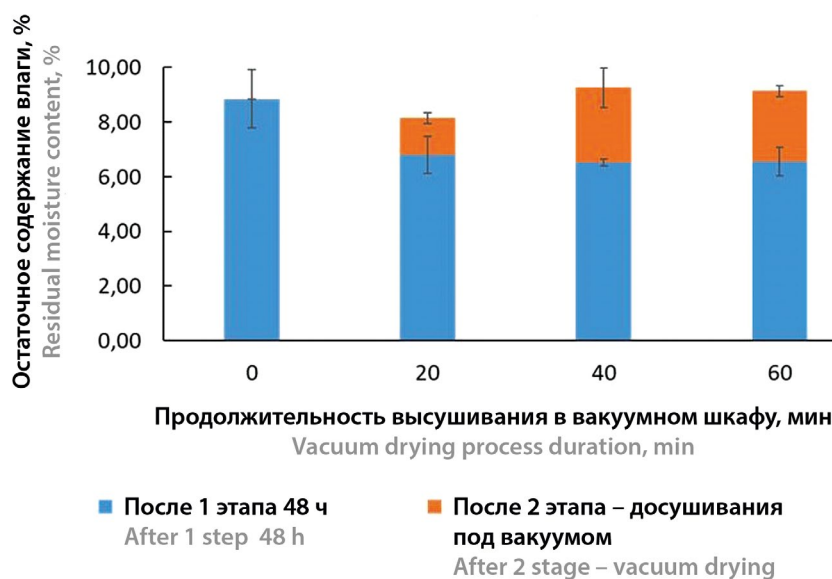


Рисунок 7. Зависимость остаточного содержания влаги в микроиглах с ЧСА от продолжительности досушивания в вакуумном сушильном шкафу при $40 \pm 2^\circ\text{C}$

Picture 7. Dependence of residual moisture in microneedles on duration of vacuum drying under $40 \pm 2^\circ\text{C}$

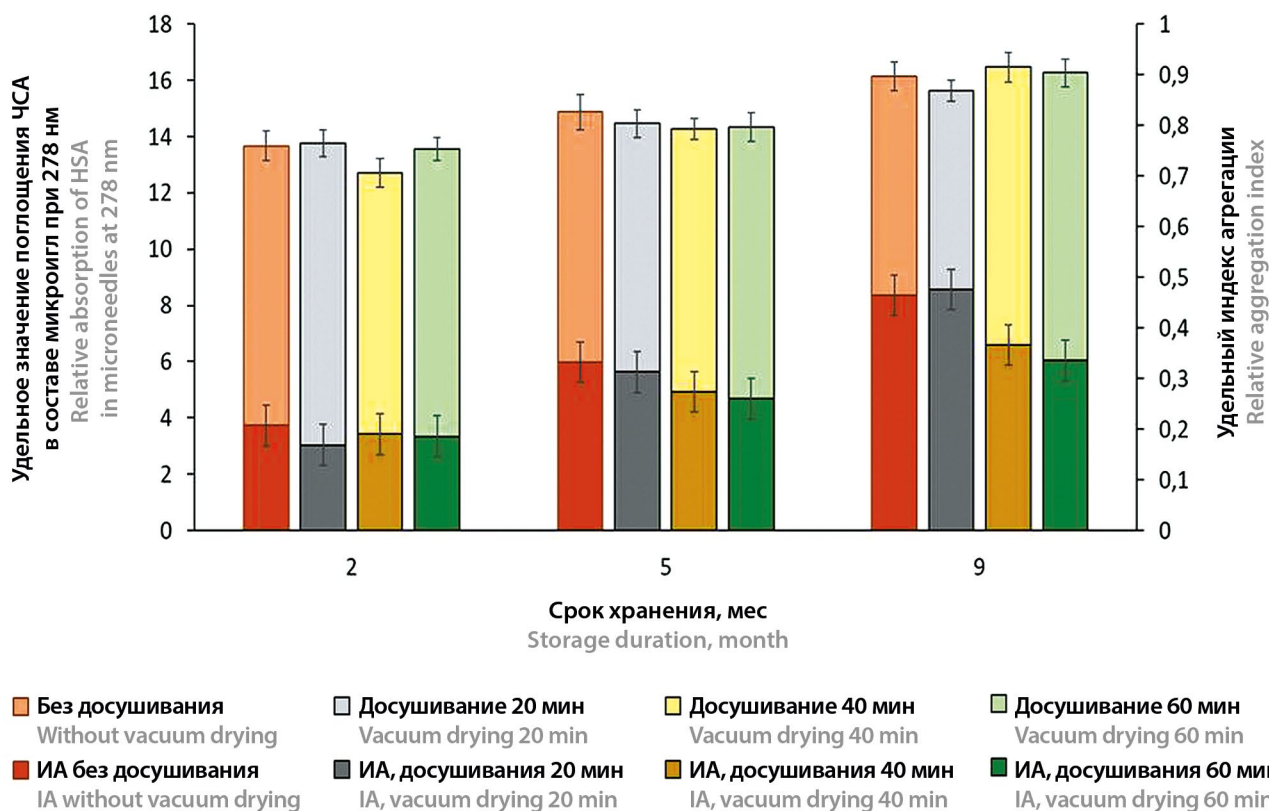


Рисунок 8. Зависимость удельного значения поглощения ЧСА в составе микроигл при 278 нм и удельного индекса агрегации от продолжительности досушивания в вакуумном сушильном шкафу при $40 \pm 2^\circ\text{C}$

Picture 8. Dependence of relative absorption of HSA in microneedles (278 nm) and relative aggregation index on duration of vacuum drying under $40 \pm 2^\circ\text{C}$

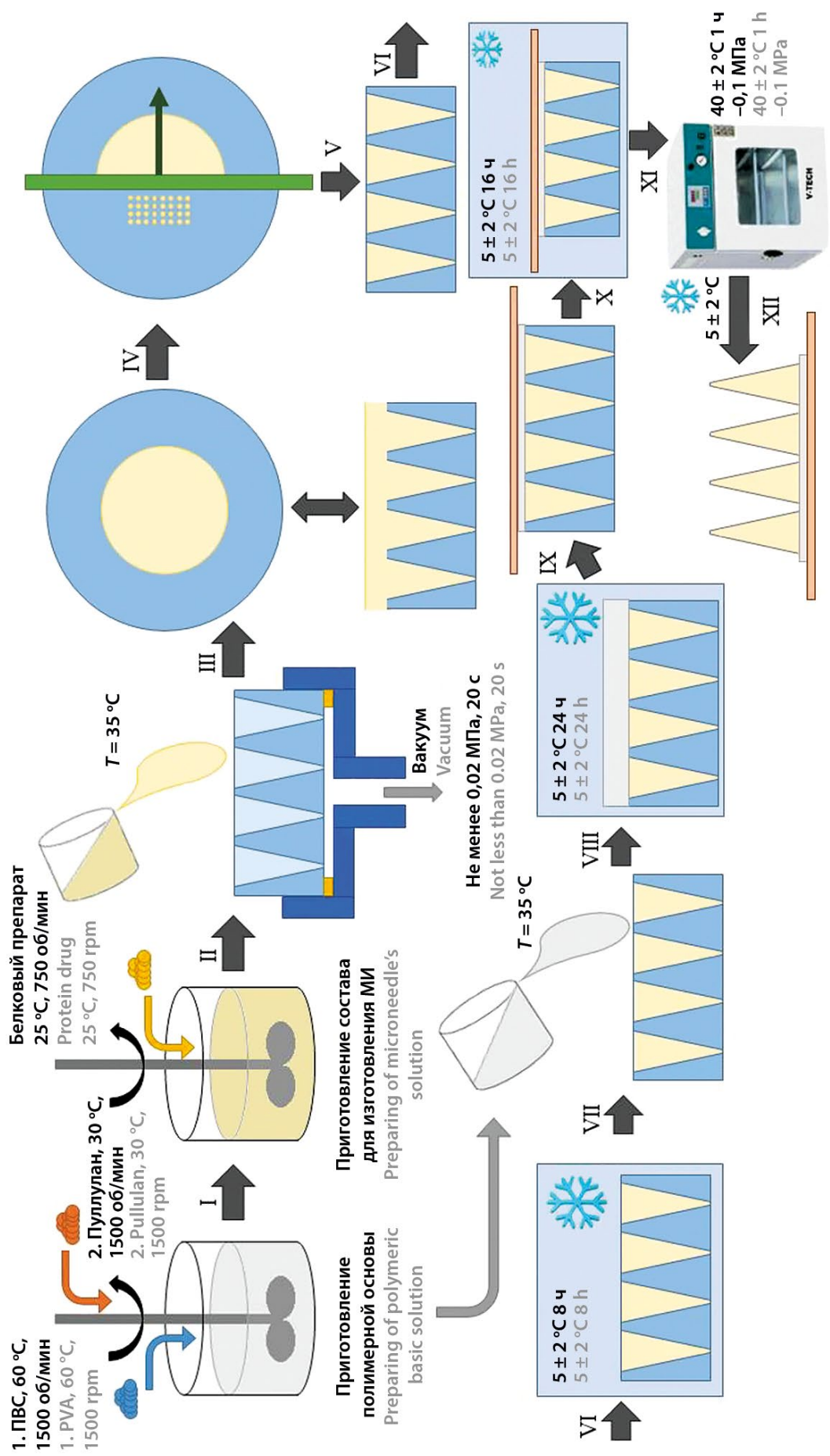


Рисунок 9. Визуализация процесса изготовления микроигл
Picture 9. The visualization of microneedle's manufacturing process

Таким образом, в качестве оптимального режима изготовления полимерных растворяющихся микроигл с белковыми препаратами предложен 2-этапный процесс получения: 1 этап – высушивание при 5 ± 2 °C в течение 48 ч, 2 этап – досушивание при 40 °C в течение 60 мин в вакуумном сушильном шкафу. Данный режим позволяет получать микроиглы с минимальным остаточным содержанием влаги, и при этом наблюдается максимальная стабилизация структуры белка в процессе изготовления и хранения.

Процесс изготовления растворяющихся полимерных микроигл с белковым препаратом (см. рисунок 9) включает в себя приготовление полимерной основы для микроигл (будущая подложка микроигл), в часть которой вносят необходимое количество препарата – состав для изготовления самих микроигл (I). Далее состав кратковременно нагревают до температуры 35 °C, дегазируют и подают в мастер-формы (II). Для заполнения сквозных микрополостей состав подают со стороны больших отверстий, а со стороны меньших отверстий создают вакуум. После заполнения микрополостей излишки раствора сверху и снизу мастер-формы удаляют и возвращают обратно в технологический процесс (III–V), заполненные мастер-формы отправляют на высушивание при 5 ± 2 °C на 8 ч (VI). Затем сверху наносят еще слой нагретого до температуры 35 °C и дегазированного состава основы для формирования подложки микроигл (VII). Формы отправляют на высушивание при 5 ± 2 °C на 24 ч (VIII), сверху на подложку наносят клеевую основу (IX), высушивают еще 16 ч при 5 ± 2 °C (X), а затем досушивают при 40 ± 2 °C в течение 60 мин в вакуумном сушильном шкафу (XI). Далее вынимают готовый массив при охлаждении мастер-формы (XII), упаковывают, проводят стерилизацию γ -лучами [10] и затем контроль качества полученных микроигл.

Контроль качества изготовленных микроигл предлагается проводить по следующим параметрам: внешнему виду (размер массива, количество микроигл, геометрия микроигл), остаточному содержанию влаги, однородности дозирования, растворению, количественному содержанию ЧСА, стерильности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из основных ограничений, не позволяющих системам доставки на основе микроигл выйти на фармацевтический рынок, являются проблемы с масштабированием их производства. В данной работе была предложена технология получения полимерных растворяющихся микроигл с использованием комбинации мастер-форм из ПЭТФ и сквозных микрополостей в них, что решает проблему с полной заполнением форм и воспроизводимостью производственного процесса. Кроме того, данная технология позволяет сохранить белковые препараты в про-

цессе производства, а также может быть масштабирована, что делает ее перспективной для производства систем доставки вакцин на основе полимерных растворяющихся микроигл.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kulkarni D., Gadade D., Chapaitkar N., Shelke S., Pekamwar S., Aher R., Ahire A., Avhale M., Badgule R., Bansode R., Bobade B. Polymeric microneedles: an emerging paradigm for advanced biomedical applications. *Scientia Pharmaceutica*. 2023;91(2):27. DOI: 10.3390/scipharm91020027.
2. Nguyen H. X., Nguyen C. N. Microneedle-mediated transdermal delivery of biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):277. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010277.
3. Phoka T., Thanuthanakhun N., Visitchanakun P., Dueanphen N., Wanichwecharungruang N., Leelahavanichkul A., Palaga T., Ruxrungtham K., Wanichwecharungruang S. Detachable-dissolvable-microneedle as a potent subunit vaccine delivery device that requires no cold-chain. *Vaccine*. 2023;15:100398. DOI: 10.1016/j.jvacx.2023.100398.
4. Vander Straeten A., Sarmadi M., Daristotle J. L., Kanelli M., Tostanoski L. H., Collins J., Pardeshi A., Han J., Varshney D., Eshaghi B., Garcia J., Forster T. A., Li G., Menon N., Pyon S. L., Zhang L., Jacob-Dolan C., Powers O. C., Hall K., Alsaiahi S. K., Wolf M., Tibbitt M. W., Farra R., Barouch D. H., Langer R., Jaklenec A. A microneedle vaccine printer for thermostable COVID-19 mRNA vaccines. *Nature Biotechnology*. 2024;42(3):510–517. DOI: 10.1038/s41587-023-01774-z.
5. Feng Y.-X., Hu H., Wong Y.-Y., Yao X., He M.-L. Microneedles: an emerging vaccine delivery tool and a prospective solution to the challenges of SARS-CoV-2 mass vaccination. *Pharmaceutics*. 2023;15(5):1349. DOI: 10.3390/pharmaceutics15051349.
6. Lee I.-C., Lin W.-M., Shu J.-C., Tsai S.-W., Chen C.-H., Tsai M.-T. Formulation of two-layer dissolving polymeric microneedle patches for insulin transdermal delivery in diabetic mice. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017;105(1):84–93. DOI: 10.1002/jbm.a.35869.
7. Chen H., Wu B., Zhang M., Yang P., Yang B., Qin W., Wang Q., Wen X., Chen M., Quan G., Pan X., Wu C. A novel scalable fabrication process for the production of dissolving microneedle arrays. *Drug Delivery and Translational Research*. 2019;9(1):240–248. DOI: 10.1007/s13346-018-00593-z.
8. Zolotareva M. S., Kedik S. A., Kobysheva N., Kondratenko V. S., Panov A. V., Shygapov A. E. Laser producing of microcavities for manufacturing dissolving polymeric microneedles. *Instruments*. 2022;4:37–41. (In Russ.)
9. Pignataro M. F., Herrera M. G., Dodero V. I. Evaluation of peptide/protein self-assembly and aggregation by spectroscopic methods. *Molecules*. 2020;25(20):4854. DOI: 10.3390/molecules25204854.
10. McCrudden M. T. C., Alkilani A. Z., Courtenay A. J., McCrudden C. M., McCloskey B., Walker C., Alshraideh N., Luton R. E. M., Gilmore B. F., Woolfson A. D., Donnelly R. F. Considerations in the sterile manufacture of polymeric microneedle arrays. *Drug Delivery and Translational Research*. 2015;5:3–14. DOI: 10.1007/s13346-014-0211-1.



Масштабирование процесса нанесения пленочных покрытий на примере витаминно-минеральных комплексов: от идеи до валидации процесса

А. В. Стрелкова✉, Е. В. Флисюк

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Стрелкова Анна Владимировна. E-mail: anna.strelkova@pharminnotech.com

ORCID: А. В. Стрелкова – <https://orcid.org/0000-0002-6188-6832>;
Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Статья поступила: 14.02.2024

Статья принята в печать: 02.08.2024

Статья опубликована: 02.08.2024

Резюме

Введение. Разработка бездефектных режимов нанесения пленочной оболочки является актуальной задачей при проведении трансфера технологии таблеток, покрытых пленочной оболочкой. Трансфер технологий – неотъемлемая стадия жизненного цикла любого лекарственного средства, допущенного к промышленному производству. Во время проведения отработки технологического процесса могут возникнуть отклонения, для устранения которых требуется вводить вспомогательные операции или менять цепочку технологического оборудования.

Цель. Оптимизировать процесс нанесения пленочного покрытия на таблетки ядра витаминно-минерального комплекса.

Материалы и методы. Объектами исследования были выбраны двояковыпуклые таблетки-ядра в форме лодочки витаминно-минерального комплекса, состоящего из витаминов С + Е + В₁ и минералов. Для обеспечения требуемых технологических свойств использовались вспомогательные вещества: микрокристаллическая целлюлоза, кроскармеллоза натрия, крахмал картофельный, кальция стеарат, кремния диоксид коллоидный. В качестве пленкообразующей композиции использовалась готовая пленкообразующая смесь (Colorcon®) бежевого цвета Opadry® II 85F 270000. Нанесение пленочной оболочки осуществлялось в коатерах с перфорированным барабаном BG-80 (Pro-face, Китай) и BGK-150 (Zhejiang Canaan Technology Limited, Китай).

Результаты и обсуждение. Изучен процесс нанесения пленочного покрытия на таблетки-ядра витаминно-минерального комплекса. Анализ действующей технологической цепочки показал ряд недостатков: большое количество ручного труда, необходимость матирования барабана, длительность процесса, небольшую загрузку, торможение производственного цикла из-за отставания на стадии нанесения пленочной оболочки. Для решения обнаруженных проблем был разработан проект масштабирования технологии на стадии нанесения пленочной оболочки на таблетки-ядра витаминно-минерального комплекса. В ходе реализации процесса было закуплено и смонтировано на производстве новое оборудование. Отработка технологического процесса позволилакратно увеличить единовременную загрузку в коатер (в 2–3 раза), автоматизировать процесс за счет функции автоматической работы по заданным до начала технологического процесса параметрам, исключить матирование барабана из подготовительных работ. Качество таблеток, покрытых пленочной оболочкой, улучшилось, риск возникновения дефектов значительно снизился.

Заключение. В ходе исследования было доказано, что перенос процесса нанесения пленочного покрытия на другую единицу оборудования может улучшить качество получаемых таблеток, покрытых пленочной оболочкой, и оптимизировать технологический процесс. Кратное увеличение размера загрузки не осуществляется за то же самое время за счет изменения количества форсунок и внутреннего сечения шланга для нанесения материала пленочного покрытия.

Ключевые слова: коатер, дефекты внешнего вида, матирование, трансфер технологии

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

Вклад авторов. А. В. Стрелкова провела исследовательскую работу, обработку результатов. А. В. Стрелкова и Е. В. Флисюк участвовали в обсуждении результатов исследования, написании текста статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Стрелкова А. В., Флисюк Е. В. Масштабирование процесса нанесения пленочных покрытий на примере витаминно-минеральных комплексов: от идеи до валидации процесса. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):85–92. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1746>

Scale-up of the film coating process using the example of vitamin and mineral complexes: from idea to process validation

Anna V. Strelkova✉, Elena V. Flisyuk

Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna V. Strelkova. **E-mail:** anna.strelkova@pharminnotech.com

ORCID: Anna V. Strelkova – <https://orcid.org/0000-0002-6188-6832>;
Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Received: 14.02.2024

Accepted: 02.08.2024

Published: 02.08.2024

Abstract

Introduction. The development of defect-free film coating modes is an urgent task when transferring film-coated tablets technology. Technology transfer is an integral stage of the life cycle of any drug approved for industrial production. During the development of the technological process, deviations may occur, to eliminate which it is necessary to introduce auxiliary operations or change the chain of technological equipment.

Aim. Optimize the process of applying a film coating to tablets of the core of the vitamin and mineral complex.

Materials and methods. The objects of the study were biconvex core tablets in the form of a boat of a vitamin and mineral complex consisting of vitamins C + E + B₁ and minerals. To ensure the required technological properties, auxiliary substances were used: microcrystalline cellulose, sodium croscarmellose, potato starch, calcium stearate, colloidal silicon dioxide. Ready-made film-forming mixtures (Colorcon®) in beige Opadry® II 85F 270000 were used as film-forming compositions. The film coating was applied in the craters with a perforated drum BG-80 (Pro-face, China) and BGK-150 (Zhejiang Canaan Technology Limited, China).

Results and discussion. The process of applying a film coating to the core tablets of a vitamin and mineral complex has been studied. The analysis of the current technological chain showed a number of disadvantages – a large amount of manual labor, the need for matting the drum, the duration of the process, low loading, braking of the production cycle due to lagging at the stage of applying the film shell. To solve the discovered problems, a project was developed to scale the technology at the stage of applying a film shell to tablets-the cores of a vitamin and mineral complex. During the implementation of the process, new equipment was purchased and installed for production. The development of the technological process made it possible to multiply the one-time loading into the boiler (by 2–3 times), automate the process due to the automatic operation function according to the parameters set before the start of the technological process, and exclude the matting of the drum from preparatory work. The quality of film-coated tablets has improved, and the risk of defects has significantly decreased.

Conclusion. During the study, it was proved that transferring the film coating process to another piece of equipment can improve the quality of the resulting film-coated tablets and optimize the technological process. A multiple increase in the loading size is not carried out at the same time by changing the number of nozzles and the inner section of the hose for applying the film coating material.

Keywords: coater, appearance defects, matting, technology transfer

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 V. Strelkova conducted research work processing the results. Anna V. Strelkova and Elena V. Flisyuk participated in the discussion of the results of the study, writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Strelkova A. V., Flisyuk E. V. Scale-up of the film coating process using the example of vitamin and mineral complexes: from idea to process validation. *Drug development & registration*. 2024;13(3):85–92. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1746>

ВВЕДЕНИЕ

Трансфер технологии (перенос технологии) – логическая процедура, обеспечивающая передачу знаний о методике, технологии или продукте вместе с документацией между организациями. Основные стороны в процессе трансфера технологий:

- передающая сторона – организация или структурное подразделение, обладающие обширными знаниями о методике, технологии или продукте и готовые передать методику, технологию или продукт;
- принимающая сторона – организация или структурное подразделение, принимающие знания о методике, технологии или продукте.

В фармацевтической отрасли можно выделить следующие виды переноса технологии:

- масштабирование на предприятие новой технологии после проведения собственных научно-исследовательских работ;
- передача технологии из одного производственного подразделения в другое в рамках одной организации;
- передача технологии от одной организации другой в рамках контракта;
- выполнение разработки технологии научными организациями и ее внедрение на промышленное предприятие;
- развитие инновационной инфраструктуры – сети инновационных комплексов, осуществляющих разработку, производство и реализацию инноваций [1–3].

Главным критерием успешного трансфера с точки зрения GMP является стабильное воспроизведение методики или технологии с сохранением всех показателей качества в соответствии со спецификацией качества силами принимающей стороны.

В процессе трансфера технологий затрагиваются различные аспекты, входящие в интегрированную фармацевтическую систему качества [4].

В данной статье подробнее будет рассмотрено масштабирование технологического процесса.

Как правило, масштабирование процесса применяется для всех лекарственных препаратов. Разработка начинается с небольших объемов на лабораторном оборудовании. Затем технология переносится на более производительное оборудование для производства пилотных серий. При передаче технологии на производство осуществляется масштабирование на промышленное оборудование [5]. Дальнейшее масштабирование процесса позволяет реализовать увеличение или уменьшение количества выпускаемой продукции за один производственный цикл.

Масштабирование может быть осуществлено в рамках одного структурного подразделения, то есть в данном случае нет разделения на передающую и принимающую стороны.

Существенной особенностью масштабирования процесса как разновидности трансфера технологий является наличие отработанных аналитических методов контроля, нормативной документации на препарат, одобренных поставщиков/производителей активной фармацевтической субстанции, вспомогательных веществ, упаковочных материалов, однако требуется заново подбирать все параметры режимов покрытия [6].

Одним из этапов разработки нового препарата является оценка рентабельности производства лекарственного препарата с учетом технологии [7]. Масштабирование технологии позволяет подстроиться под потребности рынка и производить рентабельный препарат.

Таблетированные лекарственные формы занимают значительную долю рынка среди твердых лекарственных форм [5, 8–10].

Однако среди всех показателей качества потребитель лекарственных препаратов может определить только наличие дефектов внешнего вида таблеток из-за отсутствия необходимости использовать специализированное оборудование или методы контроля. Поэтому производители лекарственных препаратов должны следить за соответствием внешнего вида (формы таблетки, целостности, фактуры поверхности) требованиям спецификации [11, 12]. Покрывающий материал должен равномерно распределяться по поверхности таблеток-ядер, обеспечивая равномерное высвобождение активной фармацевтической субстанции [8, 13–16]. В литературных источниках описано негативное влияние толщины и равномерности покрытия на высвобождение действующих веществ [13, 17–19].

Нанесение пленочной оболочки на таблетки-ядра – сложная технологическая задача из-за большого количества параметров, влияющих на качество таблеток [6, 17, 20, 21].

В связи с этим разработка мероприятий по минимизации частоты возникновения дефектов внешнего вида при нанесении пленочного покрытия на таблетки-ядра является актуальной задачей для фармацевтических предприятий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Временная диаграмма (график) Ганта

Временная диаграмма (график) Ганта – вид столбчатых диаграмм, использующихся при планировании производства для графической иллюстрации видов, последовательности и продолжительности работ.

Таблетки-ядра

Двояковыпуклые таблетки-ядра в форме лодочки витаминно-минерального комплекса следующего состава: витамины С, Е, В₁ и минералы, вспомога-

тельные вещества – микрокристаллическая целлюлоза, кроскармеллоза натрия, крахмал картофельный, кальция стеарат, кремния диоксид коллоидный.

Пленкообразующие композиции

В качестве пленкообразующей композиции использовалась готовая пленкообразующая смесь (Colorcon®) бежевого цвета Opadry® II 85F 270000.

Выбранная пленкообразующая композиция состоит из пленкообразователя – поливинилового спирта, пластификатора – макрогола, пигмента – титана диоксида и красителей.

Оборудование

Аппараты для нанесения пленочного покрытия барабанного типа (коатер) и их характеристики приведены в таблице 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс нанесения пленочной оболочки на таблетки-ядра витаминно-минеральных комплексов осуществлялся в коатере BG-80. Один производственный цикл получения таблеток, покрытых пленочной оболочкой, варьировался от 4,5 до 6 часов в зависимости от состава таблеток-ядер и состоял из загрузки 40 ÷ 45 кг таблеток-ядер.

Ручной режим работы создавал риск человеческой ошибки, оказывающей высокое влияние на качество таблеток, покрытых пленочной оболочкой.

Конструктивные особенности оборудования требовали добавления в технологический процесс обязательной вспомогательной операции – матирования барабана.

Матирование – нанесение тонкого слоя покрывающей суспензии на поверхность барабана (перфорированной части, передней и задней стенок) и лопастей. Данная операция сопровождается рисками для качества полупродукта, вызванными:

- недостаточным разогревом барабана до начала матирования;
- неверным положением форсунок во время матирования;
- ошибочно выставленным расходом покрывающего материала (из-за ручного режима);
- недостаточной продолжительностью сушки после матирования.

Перечисленные выше причины могут привести к повреждению слоя матирования за счет сил трения таблеток о барабан. Вследствие чего образуется дефект внешнего вида на таблетках, покрытых пленочной оболочкой – налипы. В данном случае налипать будет содранный с барабана слой оболочки в виде точек (рисунок 1) или полос (рисунок 2) разного размера.

Содранное матирование, кроме образования налипов на таблетках, покрытых пленочной оболочкой, может привести к образованию другого вида дефектов – потертостей (натиров) в виде черных полос на выпуклой части таблетки (рисунок 3). При исключении матирования на данной единице оборудова-

Таблица 1. Сравнение основных параметров коатеров, участвующих в исследовании

Table 1. Comparison of the main parameters of coaters participating in the study

Параметр Parameter	Коатер № 1 Coater No. 1	Коатер № 2 Coater No. 1
Наименование коатера Name of the Coater	BG-80	BGK-150
Производитель Manufacturer	Pro-face, Китай Pro-face, China	Zhejiang Canaan Technology Limited, Китай Zhejiang Canaan Technology Limited, China
Допустимая нагрузка, л Permissible load, l	30 ÷ 80	75 ÷ 150
Температура входного воздуха, °C Inlet air temperature, °C	0 ÷ 80	0 ÷ 80
Скорость вращения барабана, об/мин The speed of rotation of the drum, rpm	1 ÷ 19	2 ÷ 18
Количество форсунок Number of injectors	2	3
Внутренний диаметр шлангов / толщина стенки шлангов, мм Inner diameter of hoses / wall thickness of hoses, mm	Ø 3,2 / 1,6	Ø 4,8 / 1,6
Режим работы Operating mode	Ручной Manual	Автоматический / полуавтоматический / ручной Automatic / Semi-automatic / Manual



Рисунок 1. Белые точки на таблетках, покрытых пленочной оболочкой

Figure 1. White dots on film-coated tablets

ния для данных таблеток-ядер не удалось подобрать режимы нанесения пленочной оболочки без образования натиров.

Небольшая производительность коатера и продолжительный процесс нанесения пленочной оболочки сформировали «узкое место» в производственном цикле получения данного продукта, требующее масштабирования процесса.

Альтернативного оборудования для нанесения пленочного покрытия на производстве не было, что привело к выбору и закупке нового оборудования. Временная схема проекта отображена на ри-



Рисунок 2. Белые полосы на таблетках, покрытых пленочной оболочкой

Figure 2. White stripes on film-coated tablets



Рисунок 3. Черная полоса на таблетке, покрытой пленочной оболочкой

Figure 3. Black stripe on a film-coated tablet

сунке 4, где желтым цветом выделены работы, произведенные на производстве, а зеленым – работы, осуществленные на территории производителя оборудования.

Было закуплено и установлено новое технологическое оборудование – коатер BGK-150, который позволил увеличить производительность в 3 раза

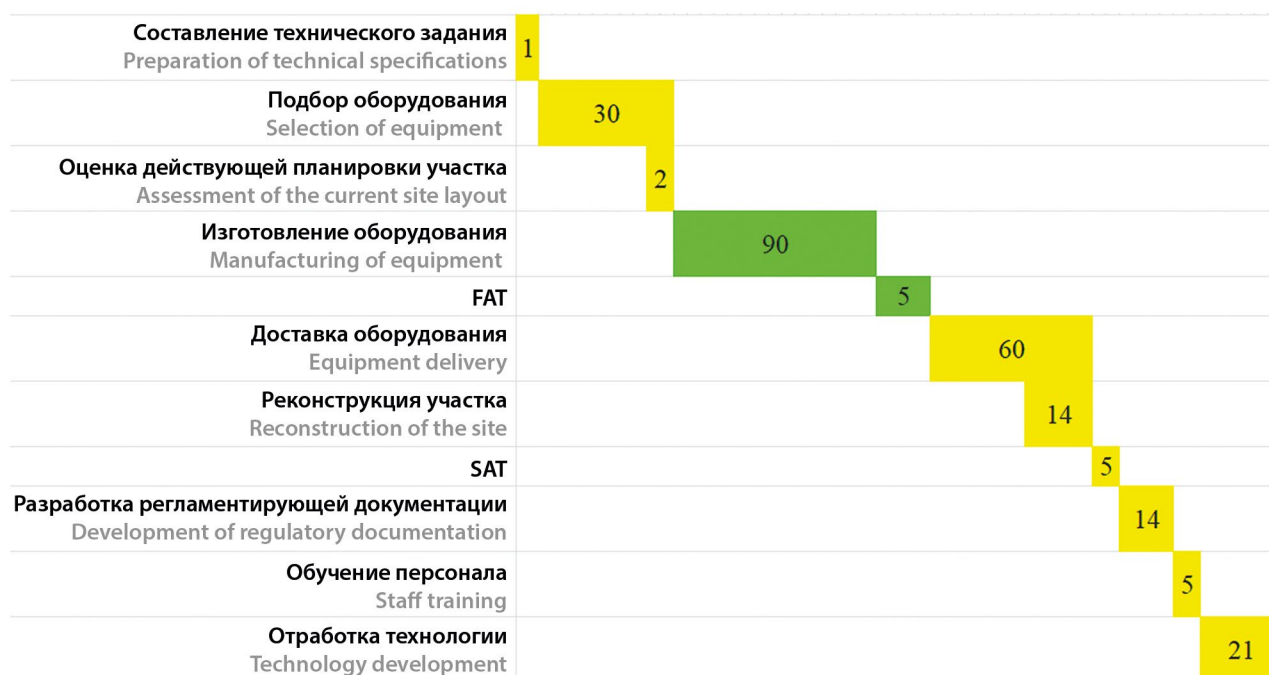


Рисунок 4. Временная диаграмма Ганта масштабирования процесса нанесения пленочного покрытия

Figure 4. Time scale diagram of the film coating process

(то есть рабочий размер загрузки был увеличен в 3 раза, с 40 кг таблеток-ядер до 120 кг, а продолжительность процесса не изменилась и составила около 6 часов). Внедрение коатера BGK-150 в производственный цикл позволило автоматизировать процесс нанесения пленочного покрытия за счет возможности работать по заранее заданным параметрам в автоматическом режиме. Данный режим работы блокирует возможность внесения каких-либо корректировок в технологические параметры во время работы, что является преимуществом для валидации процесса.

При разработке режима нанесения пленочной оболочки опирались на имеющиеся знания о продукте. Витамины, как термолабильные ингредиенты, чувствительны к нагреву, в связи с этим основным параметром стала температура выходящего воздуха (температура сердцевин). Все остальные параметры (температура входящего воздуха, расход пленкообразующей суспензии, скорость вращения барабана) были подобраны для обеспечения данной температуры на протяжении всего процесса, поддержания «текучести» слоя таблеток и сохранения качества. Объем входящего воздуха подобран исходя из возможностей оборудования для обеспечения разрежения в барабане -30 ± 5 Па на протяжении всего процесса для формирования направленного потока воздуха.

Матирование барабана коатера BGK-150 не требуется, так как натирки (черные полосы) в ходе отработки технологического процесса не обнаружены. В связи с этим риск образования наливов значительно снижается. Таким образом, в результате масштабирования качество таблеток, покрытых оболочкой, сохранилось в полном объеме и даже улучшилось.

Также были проведены успешные эксперименты по увеличению объема загрузки до $80 \div 90$ кг (в 2 раза больше первоначальной). Следовательно, размер загрузки нового коатера может меняться без изменения качества таблеток, покрытых пленочной оболочкой, что позволит поддерживать рентабельность производства без ущерба для качества.

Кривые высвобождения, полученные при контроле качества таблеток, покрытых пленочной оболочкой (рисунок 5), показывают сходимый результат между двумя аппаратами и разным размером загрузки BGK-150. В соответствии со спецификацией качества в среду растворения должно перейти не менее 75 % витаминов за 30 минут, что выполняется на всех отработанных размерах загрузки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные экспериментальные исследования процесса масштабирования нанесения пленочного покрытия на примере витаминно-минеральных комплексов позволили определить, что конструктивные особенности аппарата для нанесения покрытий (коатера) требуют использования вспомогательной операции – матирования барабана, что влечет за собой риск человеческой ошибки, оказывающей высокое влияние на качество таблеток, покрытых пленочной оболочкой.

Небольшая производительность данного коатера и продолжительный процесс нанесения пленочной оболочки сформировали «узкое место» в производственном цикле получения данного продукта, требующее масштабирования процесса. Для осуществления этого процесса было решено выбрать и закупить новое оборудование для нанесения покрытий.

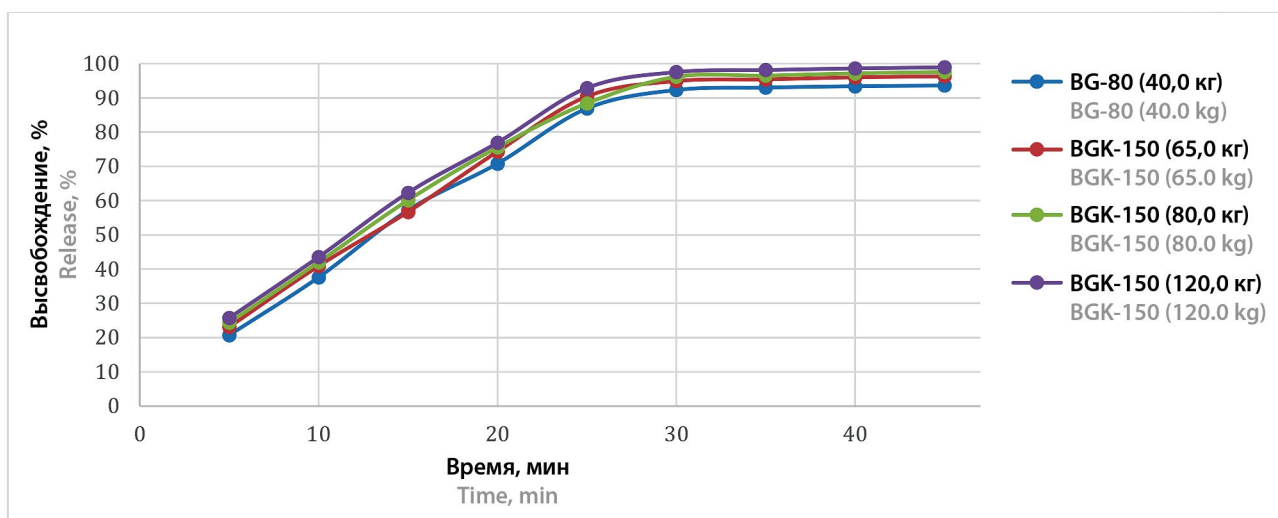


Рисунок 5. Кривые высвобождения витаминно-минерального комплекса

Figure 5. Vitamin-mineral complex release curves

Таким образом, масштабирование процесса нанесения пленочной оболочки на таблетки-ядра витаминно-минерального комплекса позволило:

- увеличить производительность;
- отработать универсальный режим нанесения пленочной оболочки, позволяющий менять размер загрузки с сохранением качества;
- сократить продолжительность производственного цикла на 2 смены за счет ускорения процесса нанесения пленочной оболочки;
- исключить вспомогательную операцию – матирование барабана;
- повысить качество таблеток, покрытых пленочной оболочкой, за счет улучшения внешнего вида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Таубэ А. А., Шигарова Л. В., Флисюк Е. В., Наркевич И. А. Обеспечение качества производства лекарственных средств: учебное пособие. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2023. 160 с. DOI: 10.33029/9704-8000-7-ОКР-2023-1-160.
2. Басевич А. В., Дзюба А. С., Каухова И. Е., Третьякова А. Е., Сахаров В. А. Оригинальный алгоритм действий при подготовке нового лекарственного препарата производителем лекарственных средств. Стадия 2: Трансфер технологий. *Формулы Фармации*. 2021;3(1):18–30. DOI: 10.17816/phf48535.
3. Li L., Kemp I., Palmer M. A DEM-based mechanistic model for scale-up of industrial tablet coating processes. *Powder Technology*. 2020;364:698–707. DOI: 10.1016/j.powtec.2020.01.087.
4. Каухова И. Е., Басевич А. В., Марченко А. Л., Григорьев Е. Г., Соловьев К. А., Буракова М. А., Пучкова Е. М. Особенности обеспечения качества лекарственных средств на этапе создания производства. *Фармация*. 2014;6:49–51.
5. Boehling P., Jacevic D., Detobel F., Holman J., Wareham L., Metzger M., Khinast J. G. Validating a numerical simulation of the ConsiGma(R) coater. *AAPS PharmSciTech*. 2021;22:10. DOI: 10.1208/s12249-020-01841-7.
6. Choi M., Porter S. C., Macht B., Meisen A. Novel coating uniformity models for tablet pan coaters. *AAPS PharmSciTech*. 2021;22(1):7. DOI: 10.1208/s12249-020-01857-z.
7. Басевич А. В., Дзюба А. С., Каухова И. Е., Андреева П. И. Разработка алгоритма создания нового препарата. Стадия 1: Фармацевтическая разработка. *Формулы Фармации*. 2019;1(1):22–31.
8. Mostafaei F., Khinast J. G., Rimmelgas J., Forgber T. Simultaneous optimization of inter- and intra-tablet coating variability in a lab-scale coating process via DEM-MC simulations. *Powder Technology*. 2023;428:118788. DOI: 10.1016/j.powtec.2023.118788.
9. Акамова А. В., Немятых О. Д., Наркевич И. А. Многовекторный маркетинговый анализ российского рынка фитопрепаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;4:276–280.
10. Наркевич И. А., Немятых О. Д., Медведева Д. М., Ладутько Ю. М., Тернинко Т. М., Загалов Д. Э., Михайлова Ю. В. Анализ российского рынка антибактериальных пре-

паратов для педиатрии. *Ремедиум*. 2019;10:52–57. DOI: 10.21518/1561-5936-2019-10-52-57.

11. Коннова А. А., Макарова Л. В. Обеспечение качества и конкурентоспособности продукции предприятий фармацевтической промышленности. *E-Scio*. 2019;5(32):428–435.
12. Покровская В. Система контроля таблеток и капсул в блистерах на базе решений COGNEX. *Control Engineering Россия*. 2019;1(79):72–75.
13. Тишков С. В., Гаврилов Д. И., Блынская Е. В., Алексеев К. В., Буюева В. В., Виноградов В. П. Особенности применения математических моделей, описывающих массообменные процессы в технологии нанесения пленочных покрытий для двояковыпуклой таблетки. *Химико-фармацевтический журнал*. 2022;56(4):28–33. DOI: 10.30906/0023-1134-2022-56-4-28-33.
14. Гуреева С. Н. Фармако-технологические и биофармацевтические аспекты нанесения покрытий на твердые лекарственные формы. *Актуальные проблемы медицины*. 2013;11(154):253–257.
15. Choi M., Porter S. C., Meisen A. Interrelationships between coating uniformity and efficiency in pan coating processes. *AAPS PharmSciTech*. 2021;4;22(8):265. DOI: 10.1208/s12249-021-02155-y.
16. Sivanapillai R., Ehrig A., Nogueira L. W., Vukosavljevic B., Grilc B., Ilic I. G., Bharadwaj R., Sibanc R. A validation of discrete-element model simulations for predicting tablet coating variability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023;642:123109. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123109.
17. Pasternak L., Sommerfeld M., Muramulla P., Yuan F.-L., Gopireddy S., Urbanetz N., Profitlich T. Tablet coating in lab-scale drum coaters: Combining DEM simulations and spray experiments to predict tablet coating. *Powder Technology*. 2023;427:118683. DOI: 10.1016/j.powtec.2023.118683.
18. Farivar F., Zhang H., Tian Z. F., Gupte A. CFD-DEM-DDM model for spray coating process in a Wurster coater. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;109(12):3678–3689. DOI: 10.1016/j.xphs.2020.09.032.
19. Chen J., Yang Q., Liu J., Jin M., He S., Zhou X., Zhou H., Dong J., Yang G., Zhu J. Understanding the correlations between tablet flow dynamics and coating uniformity in a pan coater: Experiments and simulations. *Chemical Engineering Journal*. 2023;471:144392. DOI: 10.1016/j.cej.2023.144392.
20. Christodoulou C., Sorensen E., García-Muñoz S., Mazzei L. Mathematical modeling of spray impingement and film formation on pharmaceutical tablets during coating. *Chemical Engineering Research and Design*. 2020;153:768–788. DOI: 10.1016/j.cherd.2019.11.029.
21. Liu H., Meyer R., Flamm M., Wareham L., Metzger M., Tantuccio A., Yoon S. Optimization of Critical Quality Attributes in Tablet Film Coating and Design Space Determination Using Pilot-Scale Experimental Data. *AAPS PharmSciTech*. 2021;22(1):17. DOI: 10.1208/s12249-020-01884-w.

REFERENCES

1. Taube A. A., Shigarova L. V., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Ensuring the quality of production of medicines: study guide. Moscow: GEOTAR-Media; 2023. 160 p. (In Russ.) DOI: 10.33029/9704-8000-7-ОКР-2023-1-160.

2. Basevich A. V., Dzjuba A. S., Kaukhova I. E., Tretyakova A. E., Sakharov V. A. The development of an algorithm for introduction of a new drug on the existing pharmaceutical production. Stage 2. Transfer of technologies. *Pharmacy Formulas*. 2021;3(1):18–30. (In Russ.) DOI: 10.17816/phf48535.
3. Li L., Kemp I., Palmer M. A DEM-based mechanistic model for scale-up of industrial tablet coating processes. *Powder Technology*. 2020;364:698–707. DOI: 10.1016/j.powtec.2020.01.087.
4. Kaukhova I. E., Basevich A. V., Marchenko A. L., Grigor'ev E. G., Solov'ev K. A., Burakova M. A., Puchkova E. M. Features of ensuring the quality of medicines at the stage of production creation. *Pharmacy*. 2014;6:49–51. (In Russ.)
5. Boehling P., Jacevic D., Detobel F., Holman J., Wareham L., Metzger M., Khinast J. G. Validating a numerical simulation of the ConsiGma(R) coater. *AAPS PharmSciTech*. 2021;22:10. DOI: 10.1208/s12249-020-01841-7.
6. Choi M., Porter S. C., Macht B., Meisen A. Novel coating uniformity models for tablet pan coaters. *AAPS PharmSciTech*. 2021;22(1):7. DOI: 10.1208/s12249-020-01857-z.
7. Basevich A. V., Dzjuba A. S., Kaukhova I. E., Andreeva P. I. Creating new drugs design patterns. Step one. Pharmaceutical development. *Pharmacy Formulas*. 2019;1(1):22–31. (In Russ.)
8. Mostafaei F., Khinast J. G., Rimmelgas J., Forger T. Simultaneous optimization of inter- and intra-tablet coating variability in a lab-scale coating process via DEM-MC simulations. *Powder Technology*. 2023;428:118788. DOI: 10.1016/j.powtec.2023.118788.
9. Akamova A. V., Nemyatykh O. D., Narkevich I. A. Multiple view marketing analysis of the russian plant-based drugs market. *Drug development & registration*. 2017;4:276–280. (In Russ.)
10. Narkevich I. A., Nemyatykh O. D., Medvedeva D. M., Ladut'ko Yu. M., Terninko T. M., Zagalov D. E., Mikhaylova Yu. V. Analysis of the Russian paediatric antibacterials market. *Remedium*. 2019;10:52–57. (In Russ.) DOI: 10.21518/1561-5936-2019-10-52-57.
11. Konnova A. A., Makarova L. V. Ensuring the quality and competitiveness of products of pharmaceutical industry enterprises. *E-Scio*. 2019;5(32):428–435. (In Russ.)
12. Pokrovskaya V. A control system for tablets and capsules in blisters based on COGNEX solutions. *Control Engineering Russia*. 2019;1(79):72–75. (In Russ.)
13. Tishkov S. V., Gavrilov D. I., Blynskaya E. V., Alekseev K. V., Bueva V. V., Vinogradov V. P. Peculiarities of the application of mathematical models describing mass transfer processes in film coating technology for biconvex tablet. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(4):28–33. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2022-56-4-28-33.
14. Gureeva S. N. Pharmaco-technological and biopharmaceutical aspects of overcoating on solid medicinal forms. *Challenges in modern medicine*. 2013;11(154):253–257. (In Russ.)
15. Choi M., Porter S. C., Meisen A. Interrelationships between coating uniformity and efficiency in pan coating processes. *AAPS PharmSciTech*. 2021;4;22(8):265. DOI: 10.1208/s12249-021-02155-y.
16. Sivanesapillai R., Ehrig A., Nogueira L. W., Vukosavljevic B., Grilc B., Ilić I. G., Bharadwaj R., Sibanc R. A validation of discrete-element model simulations for predicting tablet coating variability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023;642:123109. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123109.
17. Pasternak L., Sommerfeld M., Muramulla P., Yuan F.-L., Gopireddy S., Urbanetz N., Profitlich T. Tablet coating in lab-scale drum coaters: Combining DEM simulations and spray experiments to predict tablet coating. *Powder Technology*. 2023;427:118683. DOI: 10.1016/j.powtec.2023.118683.
18. Farivar F., Zhang H., Tian Z. F., Gupte A. CFD-DEM-DDM model for spray coating process in a Wurster coater. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;109(12):3678–3689. DOI: 10.1016/j.xphs.2020.09.032.
19. Chen J., Yang Q., Liu J., Jin M., He S., Zhou X., Zhou H., Dong J., Yang G., Zhu J. Understanding the correlations between tablet flow dynamics and coating uniformity in a pan coater: Experiments and simulations. *Chemical Engineering Journal*. 2023;471:144392. DOI: 10.1016/j.cej.2023.144392.
20. Christodoulou C., Sorensen E., García-Muñoz S., Mazzei L. Mathematical modeling of spray impingement and film formation on pharmaceutical tablets during coating. *Chemical Engineering Research and Design*. 2020;153:768–788. DOI: 10.1016/j.cherd.2019.11.029.
21. Liu H., Meyer R., Flamm M., Wareham L., Metzger M., Tantuccio A., Yoon S. Optimization of Critical Quality Attributes in Tablet Film Coating and Design Space Determination Using Pilot-Scale Experimental Data. *AAPS PharmSciTech*. 2021;22(1):17. DOI: 10.1208/s12249-020-01884-w.



Eudragit® EPO, модифицированный группами 4-фенилбороновой кислоты, как новый полимерный носитель с улучшенными мукоадгезивными свойствами

Д. С. Гордеева¹, Ш. Ф. Насибуллин¹, А. Г. Карпов¹, В. В. Хуторянский²✉, Р. И. Мустафин¹✉✉

¹ Институт фармации, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Казанский государственный медицинский университет Минздрава России. 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

² Reading School of Pharmacy, University of Reading. Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

✉ Контактное лицо: Хуторянский Виталий Викторович. E-mail: v.khutoryanskiy@reading.ac.uk

✉✉ Контактное лицо: Мустафин Руслан Ибрагимович. E-mail: ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: Д. С. Гордеева – <https://orcid.org/0009-0000-8591-3121>;

Ш. Ф. Насибуллин – <https://orcid.org/0000-0002-7255-8041>;

А. Г. Карпов – <https://orcid.org/0009-0002-7391-907X>;

В. В. Хуторянский – <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>;

Р. И. Мустафин – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Статья поступила: 06.07.2024

Статья принята в печать: 29.08.2024

Статья опубликована: 30.08.2024

Резюме

Введение. Большой интерес в области фармацевтической технологии проявляют к полимерам, обладающим мукоадгезивными свойствами, так как они увеличивают время пребывания лекарства на поверхности слизистой и тем самым повышают биодоступность препарата. Существуют различные мукоадгезивные системы доставки: таблетки, пленки, гели, суспензии на основе микро- и наночастиц и др. Способность к адгезии зависит от вспомогательных веществ полимерной природы, а именно от их химической структуры. Большую роль играют молекулярная масса, поверхностный заряд, гибкость полимерной цепи и наличие различных функциональных групп. Соплимеры под торговым наименованием Eudragit®, производимые немецким концерном Evonik Nutrition & Care GmbH, применяются в фармацевтической промышленности на протяжении нескольких десятилетий для получения пероральных лекарственных форм с контролируемым высвобождением. Eudragit® EPO (EPO), тройной сополимер на основе метакрилатных мономеров, обладает мукоадгезивными свойствами за счет наличия в своей структуре диметиламино групп. Предлагаемая его химическая модификация с помощью производного фенилбороновой кислоты, ввиду наличия гидроксильных групп в ее структуре, приводит к дополнительному взаимодействию с олигосахаридами муцина, обеспечивая усиление мукоадгезивных свойств Eudragit® EPO.

Цель. Синтез и исследование химически модифицированной формы Eudragit® EPO с применением 4-бромфенилбороновой кислоты с целью повышения мукоадгезивных свойств сополимера для использования в трансмукозальных системах доставки лекарств.

Материалы и методы. Синтез химически модифицированного Eudragit® EPO (BEPO) проводили в течение 24 ч при температуре 50 °С с последующей очисткой методом диализа с применением диализной мембраны (ММО = 12–14 кДа; Medicell International Ltd., Великобритания) в течение 7 дней и дальнейшим лиофильным высушиванием при –50 °С и 0,05 мБар с применением Heto Power Dry LL 3000 (Thermo Electron Corporation, США) в течение 5 дней. Подтверждение образования химически модифицированной формы BEPO проводили методами ИК-спектроскопии на приборе Nicolet iS5 (Thermo Fisher Scientific, США) и ¹H-ЯМР-спектроскопии на приборе DPX 400 МГц (Bruker, Германия). Термогравиметрический анализ (TGA) и модулированная дифференциальная сканирующая калориметрия (мДСК) проводились на приборах Discovery TGA™ и Discovery DSC™ (TA Instruments, США) соответственно. Изучение мукоадгезивных свойств проводилось по способности удерживания сополимера на изолированной слизистой носа овцы в течение 30 мин при температуре 37,0 ± 0,5 °С.

Результаты и обсуждение. Был получен BEPO со степенью замещения диметиламино групп фенилбороновой кислотой на 25 % (BEPO25) и 50 % (BEPO50). Выход BEPO25 составил 40,70 %, BEPO50 – 30,79 %. На ИК-спектрах BEPO появляются характеристические полосы в области 1605 см⁻¹, которые указывают на присоединение фенилбороновой кислоты к EPO. На ¹H-ЯМР-спектрах BEPO наблюдается образование дополнительных пиков в диапазоне 7,8 и 7,5 ppm, которые отсутствуют на спектре EPO и указывают на наличие фенилбороновой кислоты. Согласно данным TGA, полученные

образцы модифицированного ЕРО характеризуются сопоставимой с исходным ЕРО термической стабильностью. Результаты анализа ДСК-термограмм свидетельствуют, что температуры стеклования (T_с) образцов БЕРО несколько выше, чем исходного ЕРО, что может быть связано с уменьшением свободных диметиламино групп в составе терполимера. Образец БЕРО50 удерживается на поверхности изолированной слизистой носа овцы в течение 30 мин, в то время как ЕРО смывается искусственной назальной жидкостью за 5 мин.

Заключение. Получение и исследование БЕРО является перспективным направлением для дальнейшего использования в трансмукозальных системах доставки лекарств.

Ключевые слова: Eudragit® ЕРО, фенилбороновая кислота, интраназальная доставка, мукоадгезия, трансмукозальные системы доставки

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

Вклад авторов. Д. С. Гордеева осуществляла синтез химически модифицированного сополимера, ИК- и ¹H-ЯМР-спектроскопию, обработку результатов и написание статьи. Ш. Ф. Насибуллин проводил ТГА- и ДСК-анализы. А. Г. Карпов проводил изучение мукоадгезивных свойств. В. В. Хуторянский и Р. И. Мустафин принимали участие в концептуализации и методологии настоящего исследования, а также осуществляли рецензирование и корректировку статьи. Статья была написана при участии всех вышеуказанных авторов.

Благодарность. Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 23-15-00263). Также авторы выражают благодарность Правительству Республики Татарстан за предоставление гранта «Алгарыш» на научную стажировку Д. С. Гордеевой в Университете Рединга (Рединг, Великобритания), где была выполнена большая часть работы, и немецкой компании Evonik Nutrition & Care GmbH за предоставление образца Eudragit® ЕРО.

Для цитирования: Гордеева Д. С., Насибуллин Ш. Ф., Карпов А. Г., Хуторянский В. В., Мустафин Р. И. Eudragit® ЕРО, модифицированный группами 4-фенилбороновой кислоты, как новый полимерный носитель с улучшенными мукоадгезивными свойствами. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2024;13(3):93–102. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1866>

Eudragit® ЕРО, modified with 4-phenylboronic acid groups, as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties

Daria S. Gordeeva¹, Shamil F. Nasibullin¹, Alexander G. Karpov¹,
Vitaliy V. Khutoryanskiy²✉, Rouslan I. Moustafine¹✉✉

¹ Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University. 16, Fatykhа Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia

² Reading School of Pharmacy, University of Reading. Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

✉ **Corresponding author:** Vitaliy V. Khutoryanskiy. **E-mail:** v.khutoryanskiy@reading.ac.uk

✉✉ **Corresponding author:** Rouslan I. Moustafine. **E-mail:** ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: Daria S. Gordeeva – <https://orcid.org/0009-0000-8591-3121>;
Shamil F. Nasibullin – <https://orcid.org/0000-0002-7255-8041>;
Alexander G. Karpov – <https://orcid.org/0009-0002-7391-907X>;
Vitaliy V. Khutoryanskiy – <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>;
Rouslan I. Moustafine – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Received: 06.07.2024

Accepted: 29.08.2024

Published: 30.08.2024

Abstract

Introduction. In the pharmaceutical technology field there is great interest in polymers with mucoadhesive properties, as they increase the drug retention time on the mucosal surface and increase the bioavailability of the drug. There are various mucoadhesive drug delivery systems: tablets, films, gels, suspensions of micro- and nanoparticles, etc. The ability to adhesion depends on the excipients, especially on their chemical structure. Molecular weight, surface charge, flexibility of the polymer chain and the presence of various functional groups play an important role. Polymers under the trade name Eudragit®, produced by the German concern Evonik Nutrition & Care GmbH, have been used in the pharmaceutical field for several decades to produce controlled-release oral dosage forms. Eudragit® ЕРО (ЕРО) is a ternary copolymer based on methacrylic acid derivatives and has mucoadhesive properties due to the presence of dimethylamino groups in its structure. The proposed chemical modification of Eudragit® ЕРО with a phenylboronic acid derivative, due to the presence of hydroxyl groups in their structure, leads to additional interaction with mucin oligosaccharides, providing enhanced mucoadhesive properties of this polymer.

Aim. Synthesis and study of a chemically modified Eudragit® ЕРО using 4-bromophenylboronic acid in order to increase the mucoadhesive properties of the copolymer for use in transmucosal drug delivery systems.

Materials and methods. The synthesis of chemically modified Eudragit® ЕРО (БЕРО) was carried out for 24 hours at 50 °C, followed by purification by dialysis using a dialysis membrane (MMO = 12–14 kDa; Medicell International Ltd, UK) for 7 days and freeze drying at –50 °C and 0.05 mbar using Heto Power Dry LL 3000 (Thermo Electron Corporation, USA) for 5 days.

Confirmation of the formation of BEPO was carried out by ATR-FTIR spectroscopy on a Nicolet iS5 spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA) and ^1H -NMR spectroscopy on a DPX 400 MHz device (Bruker, Germany). Thermogravimetric analysis (TGA) and modulated differential scanning calorimetry (mDSC) were performed using Discovery TGA™ and Discovery DSC™ (TA Instruments, USA), respectively. The study of mucoadhesive properties was performed by the ability to retain the copolymer on the isolated sheep nasal mucosa at $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 30 minutes.

Results and discussion. BEPO was prepared with a substitution degree of dimethylamino groups with phenylboronic acid of 25 % (BEPO25) and 50 % (BEPO50). The yields of BEPO25 and BEPO50 were 40.70 and 30.79 %. The new characteristic band appears at 1605 cm^{-1} in the IR spectrum of BEPO, which indicates the attachment of phenylboronic acid to EPO. In the ^1H -NMR spectrum of BEPO, the formation of additional peaks in the range of 7.8 and 7.5 ppm is observed, which are absent in the EPO spectrum, which indicates the presence of phenylboronic acid. According to TGA results the samples of boronated EPO have the thermal stability similar to the original EPO. The results of DSC analysis show that the glass transition temperature (T_g) of BEPO samples is somehow higher than the original EPO, which is probably associated with a decrease in the amount of free dimethylamino groups in the terpolymer structure. BEPO50 is retained on the surface of isolated sheep nasal mucosa for 30 minutes, while EPO is washed off with artificial nasal fluid in 5 minutes.

Conclusion. The development and study of BEPO is a promising direction for further use in transmucosal drug delivery systems.

Keywords: Eudragit® EPO, phenylboronic acid, nasal delivery, mucoadhesion, transmucosal delivery systems

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. Daria S. Gordeeva performed the synthesis of the chemically modified copolymer, FTIR and ^1H -NMR spectroscopy, processing of the manuscript results and writing. Shamil F. Nasibullin carried out TGA and DSC analysis. Alexander G. Karpov conducted a study of mucoadhesive properties. Vitaliy V. Khutoryanskiy and Rouslan I. Moustafine took part in the article conceptualization and methodology, and also reviewed and corrected the manuscript. The article was written with the participation of all authors.

Acknowledgment. The study was made with financial support from the Russian Science Foundation (RSF № 23-15-00263). The authors express their gratitude to the Government of the Republic of Tatarstan for providing the "Algarysh" grant for the internship of Daria S. Gordeeva at the University of Reading (Reading, UK), where most of the research was carried out, and German company Evonik Nutrition & Care GmbH for providing a sample of Eudragit® EPO.

For citation: Gordeeva D. S., Nasibullin S. F., Karpov A. G., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Eudragit® EPO, modified with 4-phenylboronic acid groups, as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties. *Drug development & registration*. 2024;13(3):93–102. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1866>

ВВЕДЕНИЕ

Способность материалов к адгезии представляет широкий интерес для фармацевтической промышленности ввиду их использования в качестве вспомогательных веществ для таргетной доставки, пролонгированного действия и повышения биодоступности лекарственных веществ (ЛВ) [1].

Трансмуккозальные системы доставки лекарств могут быть представлены в виде таблеток, пастилок, твердых вставок, пластин, пессариев, пленок, гелей, вязких растворов, суспензий микро- и наночастиц и спреев. Большинство этих лекарственных форм (ЛФ) содержат полимерные наполнители, которые и играют важную роль в их мукоадгезивности. Некоторые мукоадгезивные полимеры могут не только увеличивать время пребывания ЛФ в месте введения, но также усиливать проницаемость лекарственных средств (ЛС) через эпителий за счет модификации

плотных контактов между клетками [2]. Мукоадгезивные свойства полимеров зависят от их структуры и наличия заряженных групп или неионогенных функциональных групп, способных взаимодействовать с поверхностями слизистых оболочек путем образования водородных связей. Таким образом, к основным свойствам, которые оказывают влияние на способность полимеров к мукоадгезии, относятся: возможность образовывать водородные связи за счет наличия в их структуре функциональных групп (карбоксильные, гидроксильные, амино- и сульфатные группы), гибкость полимерной цепи, катионная и анионная природа полимера, большая молекулярная масса полимера, а также свойства поверхностной энергии [3].

Существует несколько способов увеличения мукоадгезивности высокомолекулярных соединений, а именно: их химическая модификация, введение новых функциональных групп или конъюгация с други-

ми молекулами (акрилаты, малеимиды, катехолы и др.) [4]. Например, получение тиомеров – введение тиольных групп в полимеры. Тиольные группы способны образовывать дисульфидные связи с остатками цистеина в составе поверхности слизистой оболочки, тем самым обеспечивая мукоадгезивные свойства [5–7]. Известно, что 1,2-цис-дио́лы в составе производных бороновой кислоты, в частности фенолбороновой кислоты (ФБК), могут взаимодействовать с остатками олигосахаридов слизистой, что придает макромолекулам мукоадгезивные свойства [8]. Наличие малеимидных групп в структуре наногелей, липосом или наночастиц обеспечивает мукоадгезивность за счет «клик-реакций» тиол-ен с тиольными группами цистеина гликопротеинов слизистой путем образования ковалентных связей [9–13]. Акрилоилирование – это один способ модификации полимеров с целью улучшения мукоадгезивных свойств. Акрилоилированные полимеры впервые были предложены Davidovich-Pinhas и Bianco-Peled, они также образуют ковалентные связи с цистеиновыми остатками гликопротеинов на поверхности слизистой оболочки [14–15]. Ранее было выполнено акрилоилирование катионного терполимера Eudragit® EPO. Результаты исследования *ex vivo* с применением изолированной слизистой носа овец показали усиление мукоадгезивных свойств [16].

В последнее время полимерные материалы, имеющие в своей структуре ФБК, привлекают большое внимание. ФБК – синтетическое соединение, способное взаимодействовать с 1,2-цис-диолами полисахаридов и гликопротеинов слизистой [17]. Производные ФБК могут быть представлены в виде водорастворимых синтетических полимеров, гидрогелей, наночастиц, мицелл и применяются в различных системах доставки лекарств, анализа ЛВ, разделения гликопротеинов и клеток [18–22]. ФБК-соединения также активно применяются в разработке и исследовании мукоадгезивных систем доставки ЛВ: вагинальной, интраназальной и окулярной [23–28]. В литературе имеются работы по химической модификации катионного природного полисахарида хитозана с применением ФБК [29–31].

Целью настоящей работы явилась разработка и исследование химически модифицированного Eudragit® EPO с применением 4-бромфенилбороновой кислоты для повышения его мукоадгезивных свойств и увеличения времени пребывания на поверхности слизистых для использования в трансмукозальных системах доставки лекарств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был использован Eudragit® EPO (EPO) – терполимер *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата с метилметакрилатом и бутилметакрилатом, (молярное соотношение 2:1:1, ММ 150 кДа) – в качестве катионного полимера (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия). Для химической модификации EPO использо-

вали 4-бромфенилбороновую кислоту (4БФБК) (Thermo Fisher Scientific, США). Тетрагидрофуран (ТГФ) и триэтиламин (ТЭА) (Sigma-Aldrich, Великобритания) использовали для растворения исходных продуктов синтеза.

Для проведения ТГА на приборе Discovery TGA™ (TA Instruments, США) образцы массой 10 мг нагревали со скоростью 10 °С/мин в алюминиевых тиглях от 30 до 500 °С. мДСК-анализ осуществлялся с использованием Discovery DSC™ (TA Instruments, США) с системой охлаждения (RCS90). Исследования проводились в атмосфере сухого азота марки 6.0 при скорости потока газа 50 мл/мин. Для этого образцы загружали в алюминиевые тигли Tzero® (TA Instruments, США). Калибровку температурной шкалы ДСК проводили с использованием в качестве стандартов *n*-октадекана и индия. Параметры модуляции: скорость нагрева 2 °С/мин, период 60 с и амплитуда 0,636 °С. Программное обеспечение TRIOS™ версии 3.1.5.3696 (TA Instruments, США) использовалось для обработки результатов ТГА и мДСК.

Для оценки мукоадгезивных свойств использовали изолированную слизистую носа овец, которую получали путем диссекции носовой перегородки из голов овец. Все ткани были использованы в течение суток после убоя животных. Головы получали из местной скотобойни и транспортировали в лабораторию в переносном холодильнике с температурным режимом от 3 до 4 °С. Носовую перегородку (1,5 × 1,0 см) извлекали с помощью ножниц. Флуоресцеинат натрия (Sigma-Aldrich, Великобритания) был использован в исследованиях по изучению мукоадгезивных свойств. Искусственную назальную жидкость (ИНЖ) готовили в соответствии с данными литературы следующего состава: 7,45 г NaCl, 1,29 г KCl и 0,24 г безводного CaCl₂ в 1000 мл деионизированной воды с доведением pH до 5,7 с помощью 1 М HCl и 1 М NaOH.

Синтез модифицированного EPO (BEPO) осуществляли в течение 24 ч при температуре 50 °С. Готовили раствор EPO его растворением в ТГФ [32]. Раствор 4БФБК в ТГФ готовили с прибавлением ТЭА для связывания выделяющегося бромистого водорода. К раствору EPO прибавляли раствор 4БФБК капельно при постоянном перемешивании. Затем в течение 7 дней проводили диализную очистку полученного продукта с применением диализной мембраны (ММО = 12–14 кДа; Medicell International Ltd., Великобритания) со сменой жидкости 3 раза в день. Диализ проводили в течение 3 дней против 7 мМ раствора HCl и деионизированной воды. В результате выпадал осадок, который отделяли от раствора и проводили диализ осадка и раствора последовательно против раствора этилового спирта (70 %), а затем деионизированной воды. Содержимое диализной мембраны подвергали заморозке при –50 °С в течение 24 ч. Затем высушивали лиофильно при –50 °С и 0,05 мБар в лиофильной сушилке Heto Power Dry LL 3000 (Thermo Electron Corporation, США) в течение 5 дней.

ИК-спектроскопию тонкоизмельченных порошков ЕРО и ВЕРО, полученных с помощью мельницы ShakIR (PIKE Technologies, США), проводили на приборе Nicolet iS5 (Thermo Fisher Scientific, США) с одиночным отражающим кристаллом ZnSe в диапазоне спектра от 4000 до 400 см⁻¹ с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения. Для обработки полученных результатов ИК-спектроскопии использовали программное обеспечение OMNIC spectra (Thermo Scientific, США).

¹H-ЯМР-спектроскопию растворов ЕРО и ВЕРО в дейтерированном хлороформе проводили на приборе DPX 400 МГц (Bruker, Германия).

Изучение мукоадгезивных свойств ЕРО и ВЕРО проводилось по способности их удержания на слизистой оболочке носовой перегородки овец [13, 16]. Для этого готовили растворы полимеров ЕРО и ВЕРО с флуоресцеинатом натрия. 10 мг сополимера растворяли в 10 мл раствора флуоресцеината натрия (0,1 мг/мл), доводили pH растворов до значения 5,7 с применением растворов 1 М HCl и 1 М NaOH и оставляли на ночь до полного растворения. 50 мкл раствора ЕРО или ВЕРО наносили на изолированную слизистую носа овцы и помещали в инкубатор SI60 (Stuart, Великобритания) при температуре 37,0 ± 0,5 °C. Затем с использованием шприцевого дозатора (Legato 110, KD Scientific Inc, США) в течение 30 мин проводили орошение слизистой ИНЖ со скоростью 0,2 мл/мин и на системе визуализации высокого разрешения CAMAG® TLC Visualizer 3 (CAMAG, Швейцария) получали флуоресцентные изображения. Каждый эксперимент повторяли трижды. Обработка полученных макроскопических изображений для построения графиков проводилась с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53e (ImageJ, США). Статистиче-

ский анализ был выполнен с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и двустороннего *t*-критерия Стьюдента с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, где *p* < 0,05 считалось значимым. Все результаты исследования представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (CO).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате синтеза был получен ВЕРО со степенью присоединения ФБК к диметиламиногруппам ЕРО 25 % (ВЕРО25) и 50 % (ВЕРО50) (рисунок 1). Выход ВЕРО25 составил 41 %, ВЕРО50 – 31 %.

Образование химически модифицированной формы ЕРО было подтверждено методами ИК- и ¹H-ЯМР-спектроскопии. ИК-спектры были отдельно записаны для лиофильно высушенных осадков и растворов, образовавшихся в ходе диализной очистки (рисунок 2). Характеристические полосы при 2820, 2822, 2870 и 2769 см⁻¹ подтверждают наличие диметиламино групп в структуре ЕРО [33]. Пики при 963, 964, 989, 990 и 991 см⁻¹ указывают на наличие четвертичных аммониевых групп [34]. А полосы в области 1605 см⁻¹ соответствуют связям С—С ароматической системы, что указывает на присоединение ФБК к ЕРО [29].

На ¹H-ЯМР-спектрах ВЕРО можно наблюдать образование дополнительных пиков в диапазоне 7,8 и 7,5 ppm, которые отсутствуют на спектре ЕРО (рисунок 3). Интенсивность пиков увеличивается с увеличением степени присоединения групп ФБК. Сигналы при 7,8 и 7,5 ppm относятся к атомам водорода в составе бензольного кольца, что свидетельствует о наличии ФБК в структуре ЕРО [29].

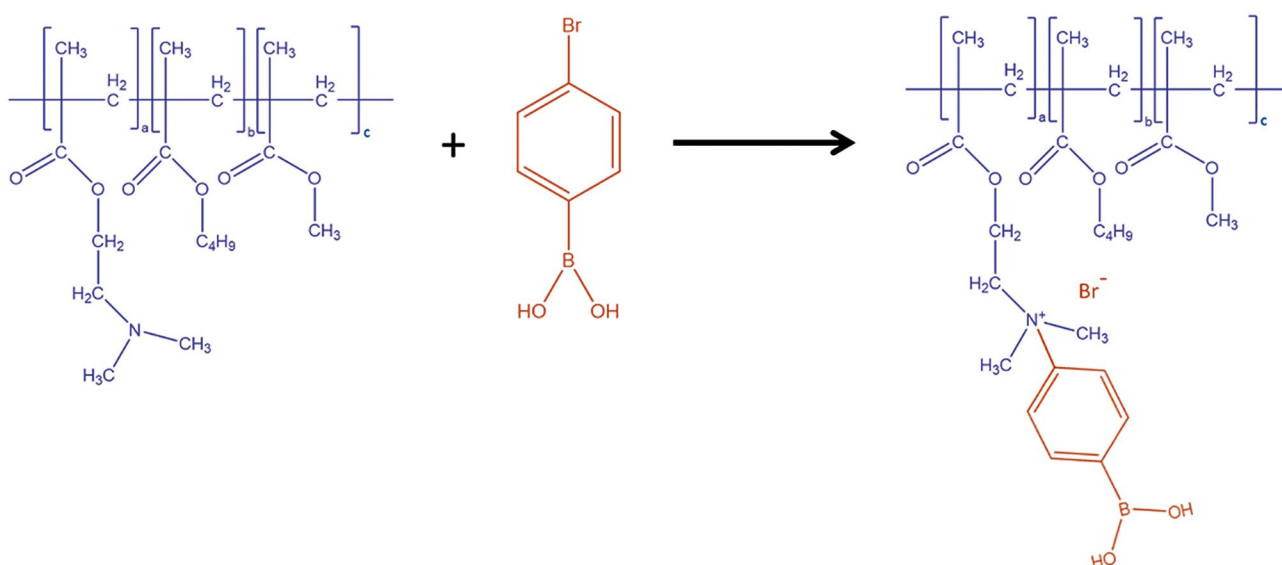


Рисунок 1. Схема синтеза модифицированного Eudragit® ЕРО с применением 4-бромфенилборовой кислоты

Figure 1. Synthesis scheme for modified Eudragit EPO® using 4-bromophenylboronic acid

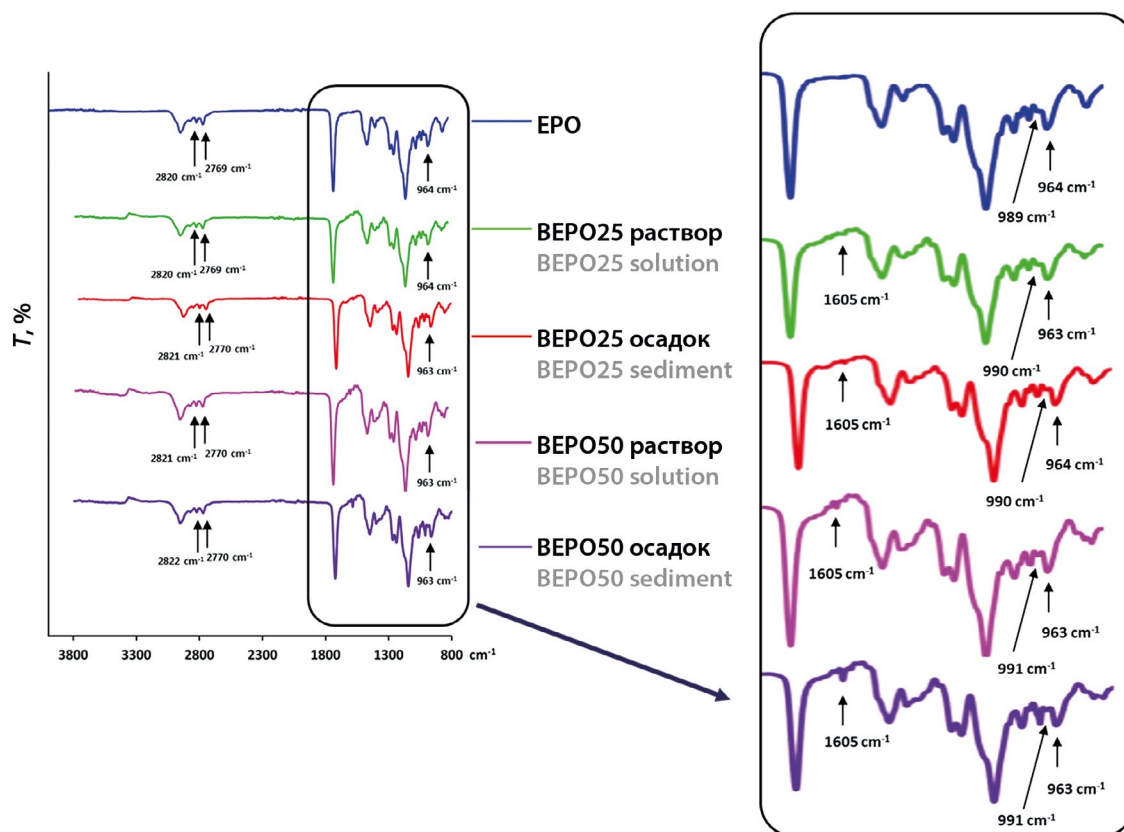


Рисунок 2. ИК-спектры ЕРО, ВЕРО25 и ВЕРО50

Figure 2. ATR-FTIR spectra of EPO, BEPO25 and BEPO50

В ходе термического анализа на термограмме ТГА немодифицированного ЕРО первая потеря массы происходит при 264–311 °С (27,7 %), что может быть связано с образованием шестичленных циклических ангидридов [35]. Вторая потеря массы наблюдается при 402–453 °С (69,6 %), что указывает на дальнейшее и полное разложение терполимера. На ТГА-термограммах образцов ВЕРО25 и ВЕРО50 (рисунок 4) первая потеря массы происходит при 261–312 °С (29,7 %) и 247–308 °С (30,8 %), вторая – при 395–434 °С (62,1 %) и 403–443 °С (62,7 %) соответственно. Как видно, данные ТГА образцов модифицированного ЕРО демонстрируют сопоставимые с исходным ЕРО результаты, что свидетельствует о термической стабильности полученных модифицированных форм ЕРО.

На мДСК-термограмме исходного ЕРО наблюдалось наличие Тс при $51,7 \pm 3,3$ °С, что согласуется с предыдущими работами [36]. В ходе модификации ЕРО 4БФБК происходит возрастание Тс для ВЕРО25 до $52,7 \pm 2,1$ °С и для ВЕРО50 – до $55,1 \pm 1,5$ °С, что, по-видимому, может быть связано с уменьшением содержания диметиламино групп в составе ЕРО и является результатом присоединения ФБК (рисунок 5).

Ввиду разработки модифицированного полимера, обладающего улучшенными мукоадгезивными свой-

вами, нами была проведена оценка удерживаемости ЕРО и ВЕРО на поверхности изолированной слизистой носа овцы после ее орошения ИНЖ. Данный метод исследования находит широкое применение при изучении способности различных систем к адгезии на поверхности слизистых оболочек [12–13, 16, 29, 37]. Для этого, в анализируемый состав вводится флуоресцеинат натрия, который обладает яркой желто-зеленой флуоресценцией при длине волны от 520 до 530 нм. После нанесения растворов ЕРО и ВЕРО с флуоресцеинатом натрия на изолированную слизистую носа овцы и орошения ее ИНЖ получают флуоресцентные изображения в УФ-свете и проводят оценку удерживаемости полимеров на ее поверхности. В ходе исследования мукоадгезивных свойств свободный ЕРО смывается ИНЖ в течение первых 5 мин эксперимента, в то время как ВЕРО удерживается на поверхности слизистой в течение 30 мин. Флуоресцентные изображения слизистой с нанесенными ЕРО и ВЕРО в смеси с флуоресцеинатом натрия до и после орошения ее ИНЖ представлены на рисунке 6, а полученные результаты обработки флуоресцентных фотографий – на рисунке 7. Гидроксильные группы в составе ФБК образуют ковалентные связи с остатками олигосахаридов слизистой, что и придает ВЕРО мукоадгезивные свойства [17].

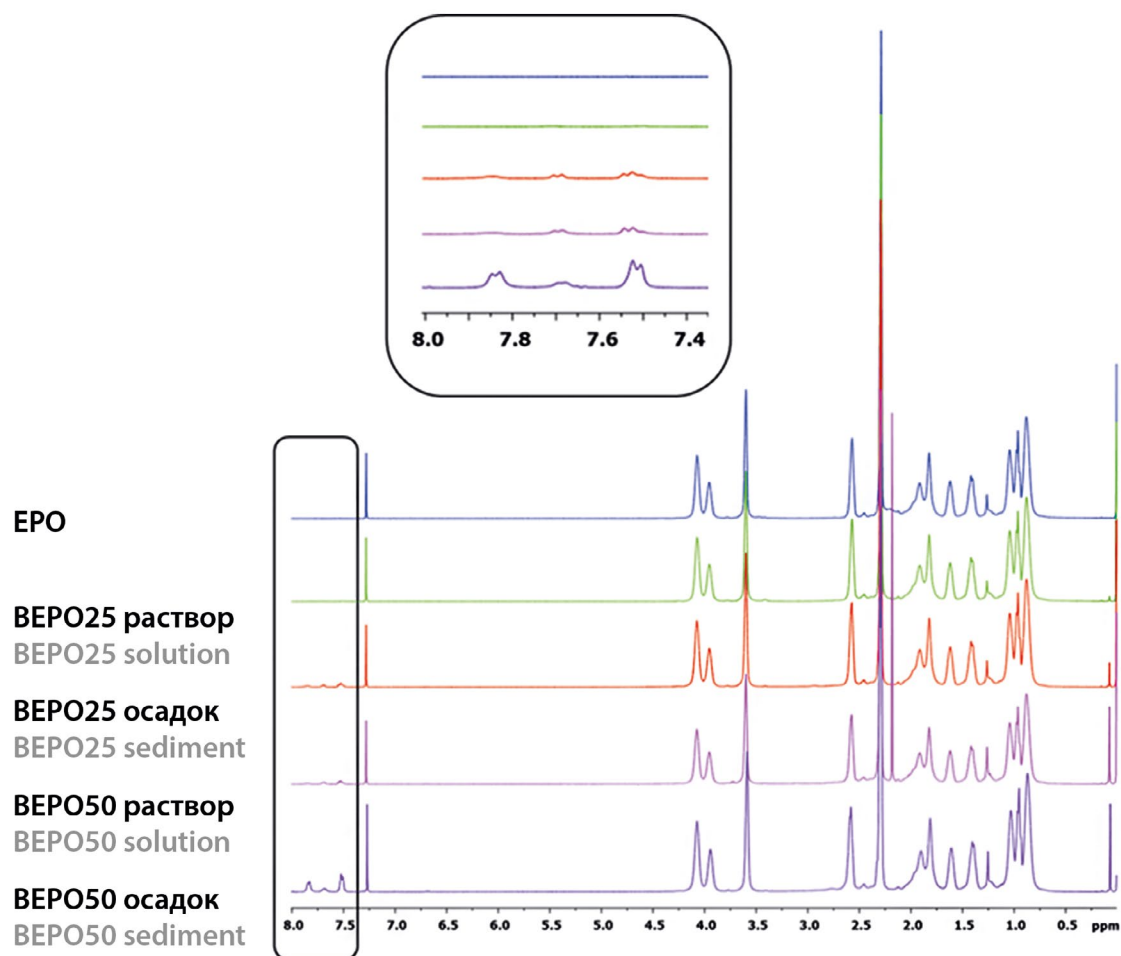


Рисунок 3. ^1H -ЯМР-спектры EPO, BEPO25 и BEPO50 (CDCl_3 , 400 МГц)

Figure 3. ^1H -NMR spectra of EPO, BEPO25 and BEPO50 (CDCl_3 , 400 MHz)

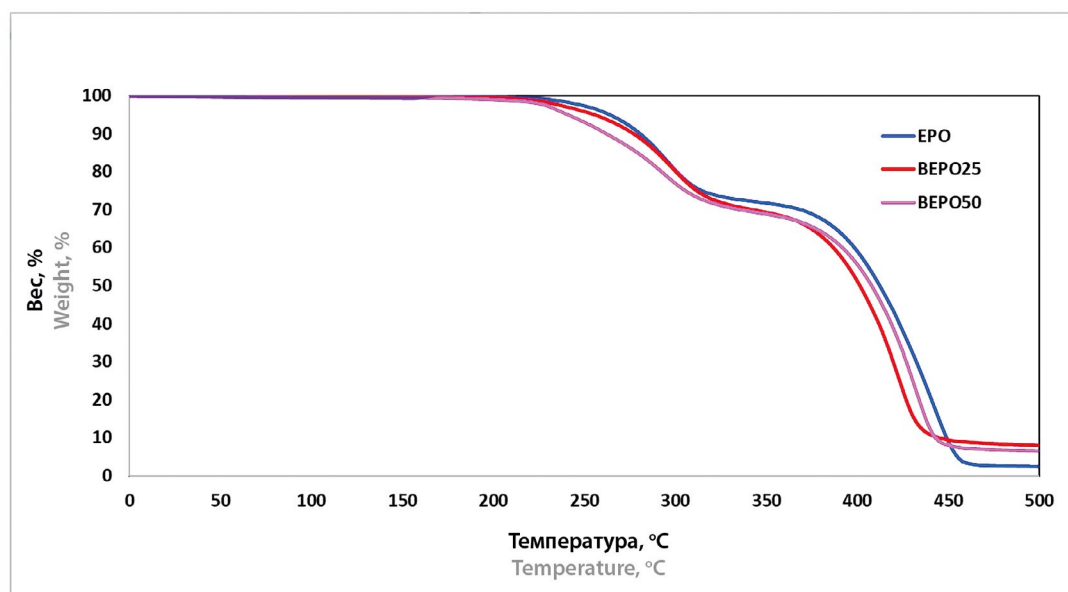


Рисунок 4. ТГА термограммы EPO, BEPO25 и BEPO50

Figure 4. TGA thermograms of EPO, BEPO25 and BEPO50

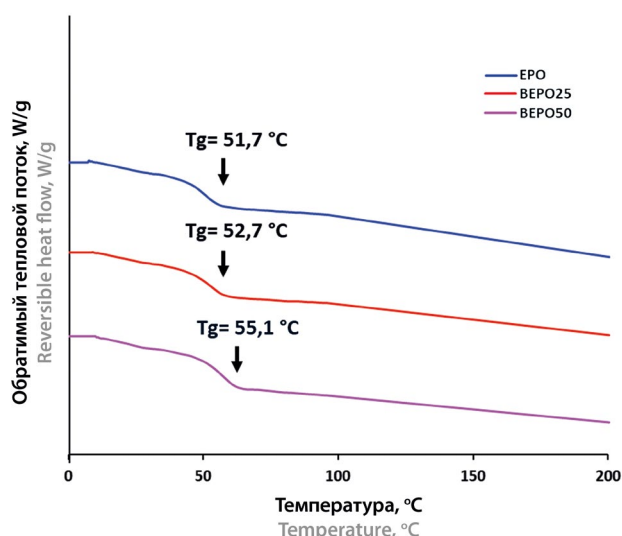


Рисунок 5. мДСК-термограммы ЕРО, ВЕРО25 и ВЕРО50

Figure 5. mDSC thermograms of EPO, BEPO25 and BEPO50

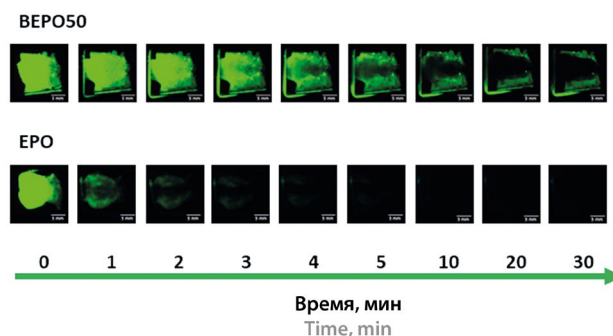


Рисунок 6. Флуоресцентные изображения слизистой оболочки носа овцы с нанесенными 1 мг/мл растворами ЕРО и ВЕРО50 с 0,1 мг/мл флуоресцеинатом натрия после орошения ИНЖ. Масштаб – 500 мкм

Figure 6. Fluorescent images of the sheep nasal mucosa with EPO and BEPO50 1 mg/mL solutions with 0.1 mg/mL sodium fluorescein after washing with ANF. Scale bar is 500 μm

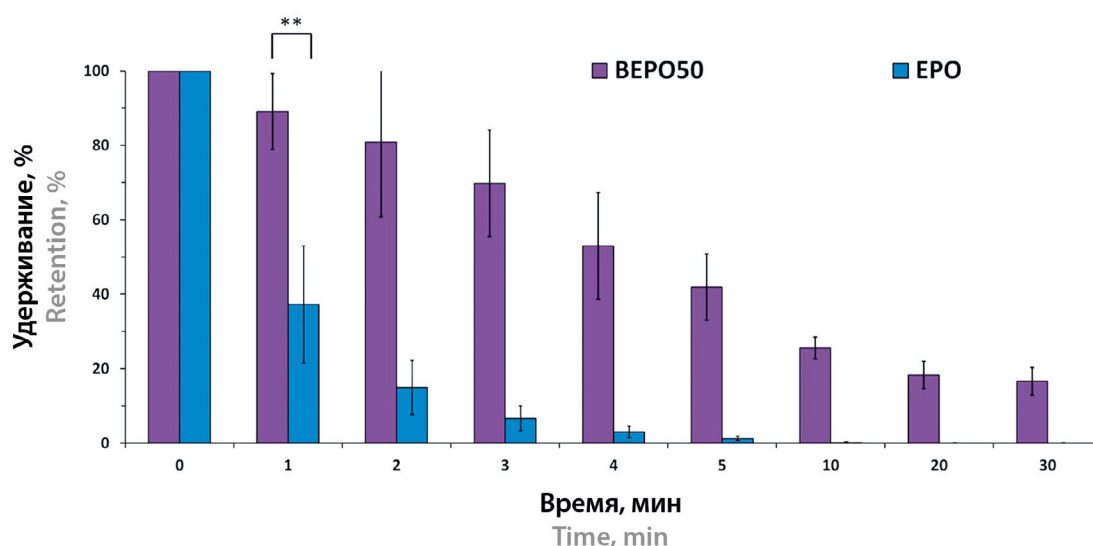


Рисунок 7. Удерживаемость 1 мг/мл растворов ЕРО и ВЕРО50 с 0,1 мг/мл раствором флуоресцеината натрия в течение 30 мин на слизистой оболочке носа овцы после орошения ИНЖ, pH 5,7 ($n = 3$, среднее значение $\pm CO$, «**» означает $p < 0,005$)

Figure 7. Retention of 1 mg/mL EPO and BEPO50 solutions with 0.1 mg/mL sodium fluorescein solution during 30 minutes on sheep nasal mucosa after washing with ANF, pH 5.7 ($n = 3$, mean $\pm SD$, «***» represents $p < 0.005$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, была получена модифицированная форма ЕРО – ВЕРО, которая обладает улучшенными мукоадгезивными свойствами на изолированной слизистой оболочке носа овец. Дальнейшие исследования фармацевтико-технологических и биофармацевтических свойств ВЕРО для применения в качестве нового перспективного носителя в системах интраназальной доставки лекарств позволят увели-

чить время удерживания, полноту всасывания препаратов и, соответственно, биодоступность препарата и эффективность фармакотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Smart J. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(11):1556–1568. DOI: 10.1016/j.addr.2005.07.001.

2. Sandri G., Rossi S., Ferrari F., Bonferoni M. C., Muzzarelli C., Caramella C. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;21(2–3):351–359. DOI: 10.1016/j.ejps.2003.10.028.
3. Lee J.W., Park J.H., Robinson J.R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000;89(7):850–866. DOI: 10.1002/1520-6017(200007)89:7<850::AID-JPS2>3.0.CO;2-G.
4. Brannigan R. P., Khutoryanskiy V. V. Progress and Current Trends in the Synthesis of Novel Polymers with Enhanced Mucoadhesive Properties. *Macromolecular Bioscience*. 2019;19(10):1900194. DOI: 10.1002/mabi.201900194.
5. Brako F., Raimi-Abraham B., Mahalingam S., Craig D. Q. M., Edirisinghe M. Making nanofibres of mucoadhesive polymer blends for vaginal therapies *European Polymer Journal*. 2015;70:186–196. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.07.006.
6. Bernkop-Schnürch A. Thiomers: A new generation of mucoadhesive polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(11):1569–1582. DOI: 10.1016/j.addr.2005.07.002.
7. Leitner V. M., Guggi D., Bernkop-Schnürch A. Thiomers in noninvasive polypeptide delivery: In vitro and in vivo characterization of a polycarbophil-cysteine/glutathione gel formulation for human growth hormone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(7):1682–1691. DOI: 10.1002/jps.20069.
8. Ivanov A. E., Galaev I. Yu., Mattiasson B. Interaction of sugars, polysaccharides and cells with boronate-containing copolymers: from solution to polymer brushes. *Journal of Molecular Recognition*. 2006;19(4):322–331. DOI: 10.1002/jmr.792.
9. Kazybayeva D. S., Irmukhametova G. S., Khutoryanskiy V. V. Thiol-Ene "Click Reactions" as a Promising Approach to Polymer Materials. *Polymer Science, Series B*. 2022;64(1):1–16. DOI: 10.1134/S1560090422010055.
10. Lowe A. B. Thiol-ene "Click" Reactions and Recent Applications in Polymer and Materials Synthesis: A First Update. *Polymer Chemistry*. 2014;5(17):4820–4870. DOI: 10.1039/c4py00339j.
11. Hoyle C. E., Bowman C. N. Thiol-ene click chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010;49(9):1540–1573. DOI: 10.1002/anie.200903924.
12. Tonglairoum P., Brannigan R. P., Opanasopit P., Khutoryanskiy V. V. Maleimide-bearing nanogels as novel mucoadhesive materials for drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016;4(40):6581–6587. DOI: 10.1039/C6TB02124G.
13. Kaldybekov D. B., Tonglairoum P., Opanasopit P., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesive maleimide-functionalised liposomes for drug delivery to urinary bladder. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;111:83–90. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.09.039.
14. Davidovich-Pinhas M., Bianco-Peled H. Novel mucoadhesive system based on sulfhydryl-acrylate interactions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(7):2027–2034. DOI: 10.1007/s10856-010-4069-6.
15. Eshel-Green T., Bianco-Peled H. Mucoadhesive acrylated block copolymers micelles for the delivery of hydrophobic drugs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;139:42–51. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.11.044.
16. Porfiryeva N. N., Nasibullina S. F., Abdullina S. G., Tukhbatullina I. K., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Acrylated Eudragit® E PO as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties for application in nasal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;562:241–248. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.027.
17. Springsteen G., Wang B. A Detailed Examination of Boronic Acid-Diol Complexation. *Tetrahedron*. 2002;58(26):5291–5300. DOI: 10.1016/S0040-4020(02)00489-1.
18. Kuzimenkova M. V., Ivanov A. E., Thammakhet C., Mikhailovska L. I., Galaev I. Yu., Thavarungkul P., Kanatharana P., Mattiasson B. Optical responses, permeability and diol-specific reactivity of thin polyacrylamide gels containing immobilized phenylboronic acid. *Polymer*. 2008;49(6):1444–1454. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.02.009.
19. Siegel R. A., Gu Yu., Lei M., Baldi A., Nuxoll E. E., Ziaie B. Hard and soft micro- and nanofabrication: An integrated approach to hydrogel-based biosensing and drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2010;141(3):303–313. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.12.012.
20. Ali S. R., Ma Yu., Parajuli R. R., Balogun Y., Lai W. Y.-C., He H. A nonoxidative sensor based on a self-doped polyaniline/carbon nanotube composite for sensitive and selective detection of the neurotransmitter dopamine. *Analytical Chemistry*. 2007;79(6):2583–2587. DOI: 10.1021/ac062068o/
21. Li Y., Pfüller U., Larsson E. L., Jungvid H., Galaev I. Yu., Mattiasson B. Separation of mistletoe lectins based on the degree of glycosylation using boronate affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001;925(1–2):115–121. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00967-0.
22. Srivastava A., Shakya A. K., Kumar A. Boronate affinity chromatography of cells and biomacromolecules using cryogel matrices. *Enzyme and Microbial Technology*. 2012;51(6–7):373–381. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2012.08.006.
23. Li C., Liu Z., Yan X., Lu W., Liu Y. Mucin-controlled drug release from mucoadhesive phenylboronic acid-rich nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;479(1):261–264. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.011.
24. Cheng C., Zhang X., Xiang J., Wang Y., Zheng C., Zhen-tan L., Li C. Development of novel self-assembled poly(3-acrylamidophenylboronic acid)/poly(2-lactobionamidoethyl methacrylate) hybrid nanoparticles for improving nasal adsorption of insulin. *Soft Matter*. 2012;8(3):765–773. DOI: 10.1039/c1sm06085f.
25. Zheng C., Guo Q., Wu Z., Sun L., Zhang Z., Li C., Zhang X. Amphiphilic glycopolymer nanoparticles as vehicles for nasal delivery of peptides and proteins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;49(4):474–482. DOI: 10.1016/j.ejps.2013.04.027.
26. Liu S., Jones L., Gu F. X. Development of mucoadhesive drug delivery system using phenylboronic acid functionalized poly(D,L-lactide)-*b*-dextran nanoparticles. *Macromolecular Bioscience*. 2012;12(12):1622–1626. DOI: 10.1002/mabi.201200216.
27. Liu S., Chang C. N., Verma M. S., Hileeto D., Muntz A., Stahl U., Woods J., Jones L. W., Gu F. X. Phenylboronic acid modified mucoadhesive nanoparticle drug carriers facilitate weekly treatment of experimentally induced dry eye syndrome. *Nano Research*. 2015;8(2):621–635. DOI: 10.1007/s12274-014-0547-3.
28. Prosperi-Porta G., Kedzior S., Muirhead B., Sheardown H. Phenylboronic-Acid-Based Polymeric Micelles for Mucoadhesive Anterior Segment Ocular Drug De-

- livery. *Biomacromolecules*. 2016;17(4):1449–1457. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00054.
29. Kolawole O. M., Lau W. M., Khutoryanskiy V. V. Synthesis and Evaluation of Boronated Chitosan as a Mucoadhesive Polymer for Intravesical Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;108(9):3046–3053. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.05.006.
30. Jiang W., Liang M., Lei Q., Deng D., Li C., Li Yu., Yuan S., Wu K., Li G., Wu S., Phenylboronic acid-functionalized chitosan for enabling transmucosal delivery for cancer therapy. *Materials & Design*. 2023;229:111843. DOI: 10.1016/j.matdes.2023.111843.
31. Li A., Chen W., Shi H., Ye Y., Gong P., Jiang B., Xiao B. Synthesis, properties, and applications of a polyampholyte hydroxypropyl chitosan derivative with the phenylboronic acid functional group. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;258(1):128721. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128721.
32. Moustafine R. I., Gordeeva D. S., Khutoryanskiy V. V., Semina I. I., Karpov A. G. Method for obtaining a carrier of biologically active compounds. Patent RUS № 2817985 C 1. 23.04.2024. Available at: <https://patent.ru/patent/RU2817985C1.pdf>. Accessed: 06.07.2024.
33. Moustafine R. I., Bobyleva V. L., Bukhovets A. V., Gari-pova V. R., Kabanova T. V., Kemenova V. A., Van den Moo-ter G. Structural transformations during swelling of poly-complex matrices based on countercharged (meth)acry-late copolymers (Eudragit®EPO/Eudragit® L 100-55). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100(3):874–885. DOI: 10.1002/jps.22320.
34. Moustafine R. I., Bodrov A. V., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Drug release modification by interpo-lymer interaction between countercharged types of Eud-ragit® RL 30D and FS 30D in double-layer films. *Interna-tional Journal of Pharmaceutics*. 2012;439(1–2):17–21. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.09.044.
35. Lin S.-Y., Yu H., Li M.-J. Formation of six-membered cyclic anhydrides by thermally induced intramolecu-lar ester condensation in Eudragit E film. *Polymer*. 1999;40(12):3589–3593.
36. Menjoge A. R., Kulkarni M. G. Mechanistic investigations of phase behavior in Eudragit® E blends. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;343(1–2):106–121. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.05.033.
37. Cook M. T., Schmidt S. A., Lee E., Samprasit W., Opanaso-pit P., Khutoryanskiy V. V. Synthesis of mucoadhesive thiol-bearing microgels from 2-(acetylthio)ethylacrylate and 2-hydroxyethylmethacrylate: novel drug delivery sys-tems for chemotherapeutic agents to the bladder. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015;3(32):6599–6604. DOI: 10.1039/c5tb00834d.



Анализ распределения и персистентности фосфорорганических пестицидов малатиона и диазинона в лекарственном растительном сырье

А. М. Савватеев¹✉, О. В. Фатеенкова¹, А. В. Браун², В. Л. Белобородов¹, И. В. Гравель¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Федеральное государственное бюджетное учреждение 27 Научный центр имени академика Н. Д. Зелинского Министерства обороны Российской Федерации (27 НЦ МО РФ). 111024, Россия, г. Москва, ул. Проезд Энтузиастов, д. 19 стр. 20

✉ Контактное лицо: Савватеев Алексей Михайлович. E-mail: savvateev_a_m@staff.sechenov.ru

ORCID: А. М. Савватеев – <https://orcid.org/0000-0002-3679-977X>;

О. В. Фатеенкова – <https://orcid.org/0000-0002-0076-5498>;

А. В. Браун – <https://orcid.org/0000-0003-2955-996X>;

В. Л. Белобородов – <https://orcid.org/0000-0003-2700-5664>;

И. В. Гравель – <https://orcid.org/0000-0002-3735-2291>.

Статья поступила: 27.04.2024

Статья принята в печать: 09.07.2024

Статья опубликована: 10.07.2024

Резюме

Введение. Определение содержания остаточных количеств пестицидов в лекарственном растительном сырье (ЛРС) и препаратах на его основе является важным этапом подтверждения безопасности на этапе контроля качества ЛРС. Для обработки лекарственных растений в процессе выращивания все более активно применяются фосфорорганические пестициды (ФОП). В литературе представлены сведения обнаружения ФОП в ЛРС, в том числе в количествах, превышающих пределы допустимого содержания, регламентированные нормативной документацией. Вместе с тем проблема распределения конкретных представителей ФОП в органах лекарственных растений (ЛР) и их персистентности остается недостаточно изученной.

Цель. Изучить распределение в различных частях ЛР и персистентность малатиона и диазинона в ноготках лекарственных, валериане лекарственной и крапиве двудомной.

Материалы и методы. В качестве модельных ЛР выбраны крапива двудомная, произрастающая повсеместно, ноготки лекарственные, исключительно культивируемые, и валериана лекарственная. Все растения разделили на три равные группы. Молодые побеги растений дважды обрабатывали средствами «Алиот», содержащим 570 г/л малатиона, и «Террадокс», содержащим 40 г/кг диазинона. Первую группу растений обрабатывали пестицидами согласно инструкции производителя, вторую группу – в количествах, в три раза превышающих рекомендуемую для внесения дозировку. Третья группа – контрольная – не подвергалась обработке пестицидами. Образцы различных частей растущих ЛР анализировались в определенные сроки методом ВЭЖХ-МС/МС по разработанной методике. Для изучения персистентности через 0,5 года осуществляли повторный анализ высушенных образцов, хранящихся без доступа солнечных лучей согласно требованиям Государственной фармакопеи РФ XV издания.

Результаты и обсуждение. Малатион и диазином обнаруживались во всех анализируемых частях ноготков лекарственных, в листьях и корнях крапивы двудомной, в олиственных побегах и корневищах с корнями валерианы лекарственной. Наибольшее содержание пестицидов зафиксировано в подземных органах растений: при обработке согласно инструкции в корнях ноготков обнаружено 16,7 мг/кг сырья малатиона и 19,6 мг/кг диазинона, в корнях крапивы – 4,5 мг/кг малатиона и 4,1 мг/кг диазинона и в корневищах с корнями валерианы лекарственной – 1,7 мг/кг малатиона и 1,5 мг/кг диазинона, что превышает допустимые нормируемые значения. Содержание пестицидов в цветках ноготков лекарственных не превышает допустимые значения. Исследование персистентности данных ФОП свидетельствует о том, что малатион и диазином сохраняются в тканях растений в течение длительного времени.

Заключение. По результатам исследования получена количественная характеристика распределения малатиона и диазинона в различных частях ноготков лекарственных, валерианы лекарственной и крапивы двудомной, а также скорость и степень деградации ФОП в течение полугодового периода.

Ключевые слова: фосфорорганические пестициды, лекарственное растительное сырье, стандартизация, персистентность, ВЭЖХ-МС/МС

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

Вклад авторов. А. М. Савватеев, И. В. Гравель, В. Л. Белобородов, О. В. Фатеенкова придумали и разработали эксперимент. О. В. Фатеенкова, А. М. Савватеев провели эксперимент. О. В. Фатеенкова, А. В. Браун провели определение малатиона и диазинона в частях лекарственных растений методом ВЭЖХ-МС/МС. Все авторы участвовали в написании текста статьи, в том числе заключения и обсуждения результатов.

Для цитирования: Савватеев А. М., Фатеенкова О. В., Браун А. В., Белобородов В. Л., Гравель И. В. Анализ распределения и персистентности фосфорорганических пестицидов малатиона и диазинона в лекарственном растительном сырье. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):103–116. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1810>

Analysis of the distribution and persistence of organophosphorus pesticides malathion and diazinon in herbal plants

Alexey M. Savvateev¹✉, Olga V. Fateenkova¹, Arkady V. Braun², Vladimir L. Beloborodov¹, Irina V. Gravel¹

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

² 27 Scientific Centre named after Academician N. D. Zelinsky Ministry of Defense of the Russian Federation. 19/20, proezd Entuziastov, Moscow, 111024, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexey M. Savvateev. **E-mail:** savvateev_a_m@staff.sechenov.ru

ORCID: Alexey M. Savvateev – <https://orcid.org/0000-0002-3679-977X>;
Olga V. Fateenkova – <https://orcid.org/0000-0002-0076-5498>;
Arkady V. Braun – <https://orcid.org/0000-0003-2955-996X>;
Vladimir L. Beloborodov – <https://orcid.org/0000-0003-2700-5664>;
Irina V. Gravel – <https://orcid.org/0000-0002-3735-2291>.

Received: 27.04.2024

Accepted: 09.07.2024

Published: 10.07.2024

Abstract

Introduction. Determination of pesticide residues presence in herbal plants and preparations based on them is an important step in confirming safety at the stage of the quality control of herbal plants. The usage of organophosphate pesticides (OPs) for the purposes of treatment of medicinal plants in the growing process is increasing. Scientific sources provide information on the detection of OPs in herbal plants, including quantities exceeding the allowed percentage limits as it is settled in regulatory documentation. At the same time, the problem of the distribution of particular kinds of OPs in the organs of herbal plants and their persistence remains understudied.

Aim. The present research aims to study the distribution in various parts of the herbal plants (marigolds, valerian, and stinging nettle) and the persistence of malathion and diazinon.

Materials and methods. Stinging nettle, that grows everywhere, exclusively cultivated marigolds, and valerian were selected as model plants. All of the plants were divided into three equal groups. Young plant shoots were processed twice with "Aliot" products containing 570 g/l of malathion and "Terradox" containing 40 g/kg of diazinon. The first group of plants was processed with pesticides following the manufacturer's instructions. The second group was treated in quantities, that were three times higher than the recommended dosage. The third group (control), was not processed with pesticides. Samples of various parts of growing herbal plants were analyzed at certain time points with the HPLC-MS/MS method according to the developed methodology. In order to study the persistence, we carried out a repeated analysis of dried samples stored without access to sunlight 0.5 years after the first one according to the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV.

Results and discussion. The authors found malathion and diazinon in all of the analyzed parts of medicinal marigolds, in leaves and roots of nettle dioecious, in deciduous shoots and rhizomes with roots of valerian officinalis. The highest proportion of pesticides was discovered in underground plant organs. When processed according to the instructions, in marigold and nettle roots and in rhizomes with valerian roots 16.7 mg/kg, 4.5 mg/kg, and 1.7 mg/kg of malathion and 19.6 mg/kg, 4.1 mg/kg, and 1.5 mg/kg of diazinon were found, respectively. These quantities exceed the allowed limits. The quantity of pesticides in the flowers of medicinal marigolds does not exceed the permissible values. The research on the persistence of these OPs data demonstrates that malathion and diazinon persist in plant tissues for a long time.

Conclusion. As a result of the research quantitative characteristics of the distribution of malathion and diazinon in various parts of medicinal marigolds, medicinal valerian, and dioecious nettle, as well as the rate and the extent of degradation of OPs during six months, were determined.

Keywords: organophosphate pesticides, herbal substances, standardization, persistence, HPLC-MS/MS

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 M. Savvateev, Irina V. Gravel, Vladimir L. Beloborodov, Olga V. Fateenkova invented, developed and conducted the experiment. Olga V. Fateenkova, Alexey M. Savvateev conducted an experiment. Olga V. Fateenkova, Arkady V. Brown determined malathion and diazinon in parts of medicinal plants using the HPLC-MS/MS method. All authors participated in writing the text of the article, including the conclusion and discussion of the results.

For citation: Savvateev A. M., Fateenkova O. V., Braun A. V., Beloborodov V. L., Gravel I. V. Analysis of the distribution and persistence of organophosphorus pesticides malathion and diazinon in herbal plants. *Drug development & registration*. 2024;13(3):103–116. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1810>

ВВЕДЕНИЕ

Для увеличения урожайности, повышения устойчивости лекарственных растений (ЛР) к болезням и вредителям в лекарственном растениеводстве используются фосфорорганические пестициды (ФОП) [1]. Содержание остаточных количеств пестицидов является одним из обязательных показателей качества лекарственного растительного сырья (ЛРС), а в соответствующей ОФС.1.5.3.11 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XV [2] регламентируется предельно допустимое содержание пестицидов. В ГФ РФ XV, Европейской фармакопее и фармакопее США, гармонизированных между собой, нормируется содержание 33 ФОП. В фармакопеях Японии и Китая не представлены пределы допустимого содержания ФОП, в Индийской фармакопее нормируется только 15 ФОП [3].

ФОП пришли на смену персистентным хлорорганическим пестицидам, и в настоящее время продолжается активное изучение путей их разложения, метаболизма и потенциального накопления в продуктах питания, ЛРС и живых организмах. Традиционно считается, что ФОП не являются персистентными пестицидами и быстро разлагаются в окружающей среде или метаболизируются в тканях растения до нетоксичных метаболитов [4]. Установлено, например, что скорость гидролиза метафоса напрямую зависит от содержания в тканях растений фосфатаз, гидролизующих эфиры фосфорной кислоты [5]. Показано, что органы растения, богатые липидными фракциями, дольше и в большем количестве удерживают пестициды, растворимые в липидах [6]. ФОП также могут растворяться в эфирных маслах растения и за счет этого не подвергаться воздействию гидролитических ферментов [7]. Влияние на сохранность ФОП в почве оказывают наличие и численность почвенных бактерий, например *Pseudomonas diminuta* [8] и *Flavobacterium* spp. [9], гидролизующих сложные эфиры фосфорной кислоты. Очевидно, что количество остаточных ФОП определяется свойст-

вами органов обрабатываемого растения и содержащейся в них биологической матрицей. Следует отметить, что вопросы распределения ФОП в различных частях растений и их деградация во времени остаются малоизученными.

Одними из распространенных ФОП, используемых в растениеводстве на территории РФ, являются малатион и диазинон (рисунок 1), доступные в свободной продаже. Они используются как в частных хозяйствах, так и в промышленном сельском хозяйстве и зарегистрированы для применения на пищевых, кормовых и декоративных культурах¹. Период полураспада диазинона в почве – 2–3 недели, но после внесения гранулированных форм он может обнаруживаться в почве и через 12–14 недель после внесения [10]. Исследования пищевой продукции (фасоль и кукуруза) показали, что остаточные количества данных ФОП обнаруживались в образцах бобов и зерен, хранившихся в открытых корзинах и герметичных деревянных ящиках, спустя полгода после обработки [11].

В литературе представлены сведения, что малатион и диазинон обнаруживаются в ЛРС в количествах выше пределов допустимого содержания (1,0 мг/кг для малатиона в сумме с малаоксоном и 0,5 мг/кг для диазинона) [3]. Например, авторы [12] обнаружили малатион в 52 % из 391 образцов ЛР (плоды аниса обыкновенного, цветки ромашки аптечной, плоды кориандра посевного, плоды фенхеля обыкновенного). Диазинон был обнаружен в образцах ЛР, распространенных в Иране: в 50 % образцов мяты, 40 % образцов ромашки, в 20 % образцов затарии и в 30 % образцов семян тмина [13].

¹ Государственная услуга по государственной регистрации пестицидов и агрохимикатов. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Доступно по: <https://mcx.gov.ru/ministry/departments/departament-rastenievodstva-mekhanizatsii-khimizatsii-i-zashchity-rasteniy/industry-information/info-gosudarstvennaya-usluga-po-gosudarstvennoy-registratsii-pestitsidov-i-agrokhimikatov/> Ссылка активна на 9.11.2023.

Цель работы – установить распределение и потенциальную персистентность малатиона и диазинона в ЛР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Малатион (CAS: 121-75-5) (рисунок 1), инсектицид и акарицид из класса ФОС, – маслянистая бесцветная жидкость с запахом тиолов, $T_{\text{кип.}}$ составляет 120 °С, летучесть – 2,26 мг/м³, плотность – 1,23 г/см³ при 25 °С, М.м. – 330,358 а.е.м. Малатион малорастворим в воде (145 мг/л), хорошо растворим в органических растворителях, за исключением углеводов. Медленно гидролизуются водой, гидролиз ускоряется в кислой и щелочной среде. Использовали приобретенное в торговой сети средство «Алиот», содержащее 570 г/л малатиона.

Диазинон (CAS: 333-41-5) (рисунок 1), инсектицид и акарицид из класса ФОС, – бесцветная жидкость со слабым запахом. $T_{\text{кип.}}$ – 89 °С, летучесть – 1,39 мг/м³, плотность – 1,12 г/см³ при 25 °С, М.м. – 304,35 а.е.м. Растворимость в воде – 40 мг/л при 20 °С, хорошо растворим в большинстве органических растворителей. Легко гидролизуются в щелочной и кислой среде. Использовали приобретенное в торговой сети средство «Террадокс», содержащее 40 г/кг диазинона.

Маркерными растительными объектами исследования служили ноготки лекарственные (*Calendula officinalis*) сортов Золотое море и Райский сад (ФГБНУ ВИЛАР), крапива двудомная (*Urtica dioica*) и валериана лекарственная (*Valeriana officinalis*) (Ботанический сад Сеченовского Университета). Пестициды вносили методом корневого полива, согласно рекомендации производителя, на стадии проростков и в период вегетации.

Реактивы. Ацетонитрил (Cat. № 7, HPLC grade, CARLO ERBA Reagents GmbH, Германия), деионизованная вода (очистка системой Milli-Q, Millipore, США), муравьиная кислота (Cat. № 1.00263, Merck, Sigma-Aldrich, США). Стандартные образцы (СО): малатион (Cat. № 36143, Supelco, Sigma-Aldrich, США), диазинон (Cat. № 74332, Supelco, Sigma-Aldrich), внутренний стандарт – синтезированный дейтерированный малатион-d6 [14].

Регламент исследования. Эксперимент проводился в Ботаническом саду Сеченовского Университета (Россия). Семена ноготков лекарственных сажали в почву в мае 2022 г., молодые побеги крапивы двудомной и валерианы лекарственной высадили в отдельные горшки в мае 2022 г. ЛР разделили на три равные группы, две из них обрабатывали пестицидами согласно схеме, представленной в таблице 1.

Собранные образцы высушивались естественным путем на воздухе без доступа солнечных лучей. Отбор проб проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0005.15 ГФ РФ XIV [2]. Пробы хранились при комнатной температуре, герметично упакованные и без доступа солнечных лучей. Анализ на содержание малатиона и диазинона проводили в два этапа по схеме, представленной на рисунке 2.

Определение ФОП в ЛРС

Количественное определение малатиона и диазинона в образцах ЛРС осуществляли методом ВЭЖХ-МС/МС по разработанной нами методике, оптимизированной по процедурам пробоподготовки, хроматографического разделения и детектирования.

Пробоподготовка. На аналитических весах взвешивали 1 г (точная навеска) измельченного в лабораторной мельнице РС, проходящего сквозь сито 1 мм, добавляли 5 мл ацетонитрила с дейтерированным

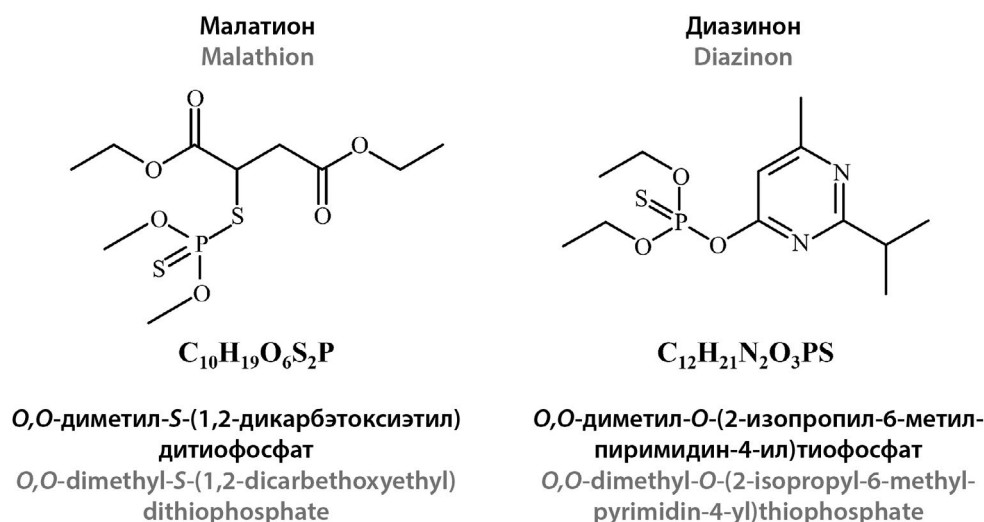


Рисунок 1. Структурные формулы малатиона и диазинона

Figure 1. Structural formulas of malathion and diazinon

Таблица 1. Схема обработки и сбора морфологических частей ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной

Table 1. The scheme of processing and collecting morphological parts of marigolds, stinging nettle, and valerian

Лекарственное растение Herbal plants	Обработка пестицидами Pesticide treatment		Часть растения и сроки сбора Part of the plant and timing of collection
	Первая (июнь 2022 г.) The first (June 2022)	Вторая (июль 2022 г.) The second (July 2022)	
Группа 1 Group 1			
Ноготки лекарственные Marigolds	Корневой полив: 6 л воды, содержащими 5 мл «Алиота» и 50 г «Террадокса» Root watering: 6 liters of water containing 5 ml of "Aliot" and 50 g of "Terradox"	Корневой полив: 6 л воды, содержащими 5 мл «Алиота» и 50 г «Террадокса» Root watering: 6 liters of water containing 5 ml of "Aliot" and 50 g of "Terradox"	Цветки – середина июля Олиственные побеги и корни – конец июля Flowers – mid-July Leafy shoots and roots – end of July
Крапива двудомная Stinging nettle			Стебли, листья, корни – сентябрь Stems, leaves, roots – September
Валериана лекарственная Valerian			Олиственные побеги и корневища с корнями – октябрь Leafy shoots and rhizomes with roots – October
Группа 2 Group 2			
Ноготки лекарственные Marigolds	Корневой полив: 6 л воды, содержащими 15 мл «Алиота» и 150 г «Террадокса» Root watering: 6 liters of water containing 15 ml of "Aliot" and 150 g of "Terradox"	Корневой полив: 6 л воды, содержащими 5 мл «Алиота» и 150 г «Террадокса» Root watering: 6 liters of water containing 15 ml of "Aliot" and 150 g of "Terradox"	Цветки – середина июля Олиственные побеги и корни – конец июля Flowers – mid-July Leafy shoots and roots – end of July
Крапива двудомная Stinging nettle			Стебли, листья, корни – сентябрь Stems, leaves, roots – September
Валериана лекарственная Valerian			Олиственные побеги и корневища с корнями – октябрь Leafy shoots and rhizomes with roots – October
Группа 3 – контрольная Group 3 – control			
Ноготки лекарственные Marigolds	Растения не подвергались обработке пестицидами Plants were not treated with pesticides	Растения не подвергались обработке пестицидами Plants were not treated with pesticides	Цветки – середина июля Олиственные побеги и корни – конец июля Flowers – mid-July Leafy shoots and roots – end of July
Крапива двудомная Stinging nettle			Стебли, листья, корни – сентябрь Stems, leaves, roots – September
Валериана лекарственная Valerian			Олиственные побеги и корневища с корнями – октябрь Leafy shoots and rhizomes with roots – October

внутренним стандартом (500 нг/мл малатион-d6), перемешивали в течение 4 минут при 500 об/мин. Далее центрифугировали при 5500 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость пропускали через шприцевой фильтр для микрофильтрации PTFE с размером пор 0,20 мкм. Органический экстракт (10 мкл) вводили в хроматограф.

Условия хроматографического разделения и детектирования. Сухое РС анализировали на

содержание малатиона и диазинона методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием жидкостного хроматографа UltiMate 3000 RSLC (Dionex Softron GmbH, Германия) с масс-селективным tandemным анализатором высокого разрешения Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, США) с ионизацией электрораспылением. ФОП разделяли на колонке ZORBAX 300SB-C18, 100 × 2,1 мм, 3,5 мкм (Agilent Technologies, США). Данные регистрировали и обрабатывали с по-

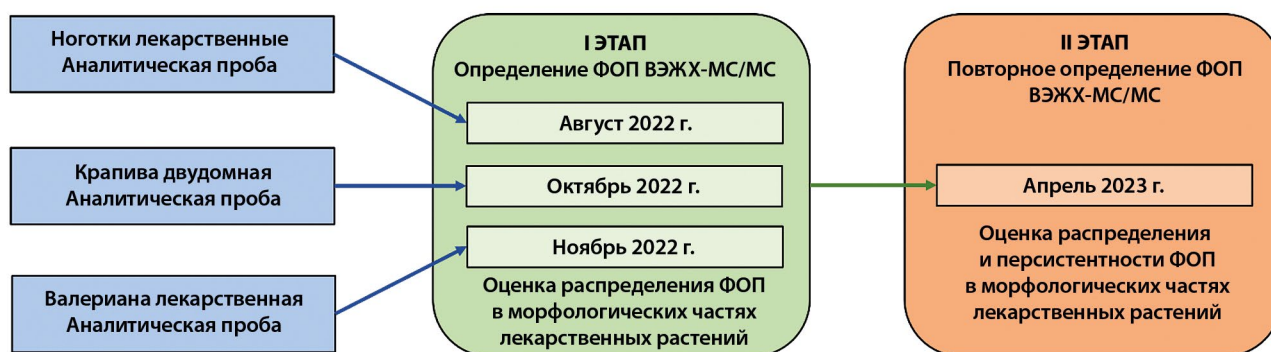


Рисунок 2. Схема анализа содержания малатиона и диазинона в ноготках лекарственных, крапиве двудомной и валериане лекарственной

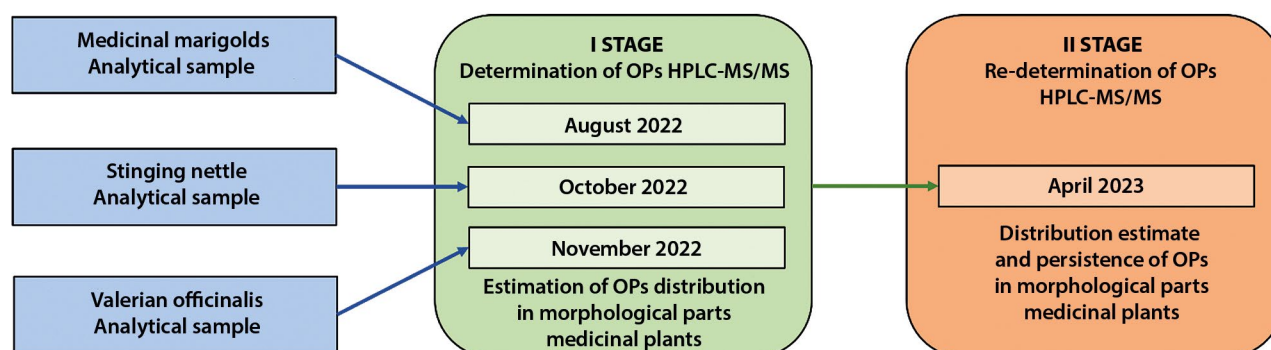


Figure 2. Scheme of analysis of malathion and diazinon presence in analytical samples of marigold, stinging nettle, and valerian officinalis

мощью программных пакетов Xcalibur™ (Thermo Scientific, США).

ФОП разделяли в режиме градиентного элюирования, скорость подвижной фазы – 0,35 мл/мин, температура термостата колонки – 40 °С. Подвижная фаза А – 0,1 об.% НСООН в воде, подвижная фаза Б – ацетонитрил. Программа элюирования: 0–2 мин: 95 % А; 2–10 мин: 5–95 % Б; 10–11 мин: 95 % Б; 11–15 мин: 95 % А.

Использовали электрораспылительную ионизацию в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Величина разрешения масс-анализатора составляла не менее 30 000 в режиме МС/МС. Оптимальные условия одновременного детектирования аналитов приведены в таблице 2. На основе анализа полученных масс-спектров СО для обоих пестицидов выбрали по два селективных MRM-перехода, используемых для детектирования и подтверждения присутствия, а для дейтерированного внутреннего стандарта – один MRM-переход. Для каждой ионной реакции оптимизировали параметры, отвечающие за настройки работы масс-детектора, – напряжение на входной линзе и тип энергии фрагментации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор лекарственных растений и аналитического метода определения фосфорорганических пестицидов

Для изучения распределения и персистентности малатиона и диазинона в качестве модельных растений выбраны следующие: крапива двудомная – дикорастущее ЛР, произрастающее повсеместно на территории Российской Федерации. Исходили также из предположения, что в связи с широким ареалом произрастания образцы крапивы могут быть использованы в качестве потенциального маркерного растения для определения загрязненности почв пестицидами перед сбором или посадкой других ЛР. Ноготки лекарственные выбраны как исключительно культивируемое растение. Валериана лекарственная является одним из самых распространенных представителей растений, используемых в фитотерапии как в нативной форме, так и в большом количестве лекарственных форм и препаратов (настойки, таблетки, капсулы, капли) [15].

Таблица 2. Оптимальные условия одновременного детектирования ФОП с использованием электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов

Table 2. Optimal conditions for simultaneous detection of OPs using electrospray ionization in the positive ion detection mode

Пестицид Pesticide	Ионная реакция Ionic reaction	Оптимальный режим фрагментации Optimal fragmentation mode	Энергия фрагментации, В Fragmentation energy, В	Назначение ионной реакции The purpose of the ionic reaction
Диазинон Diazinon	305,1083 => 169,0794	HCD**	35	Определение содержания Definition of containing
	305,1083 => 153,1022	HCD	35	Подтверждение присутствия Confirmation of presence
Малатион Malathion	331,0433 => 285,0015	CID***	25	Определение содержания Definition of containing
	331,0433 => 127,0390	HCD	15	Подтверждение присутствия Confirmation of presence
Малатион-d6* Malathion D6*	337,081 => 291,0391	CID	25	Определение содержания Definition of containing

Примечания. *Дейтерированный малатион – внутренний стандарт.
** HCD – высокоэнергетическая диссоциация.
*** CID – диссоциация, вызванная соударениями.
Note. * Deuterated malathion is an internal standard.
** HCD – high-energy dissociation.
*** CID – collision-induced dissociation.

Определение малатиона и диазинона в экспериментальных образцах

В настоящее время в ОФС мировых фармакопей (ГФ РФ XV, Европейская фармакопея, фармакопея США) не регламентируются методы определения ФОП и возможно применение любого метода, который позволяет уверенно определять содержание ФОП на том уровне, который представлен в нормативных документах. В наибольшей степени данной задаче соответствует метод ВЭЖХ-МС за счет физико-химических свойств ФОП, таких как относительно низкая летучесть и низкая термическая стабильность соединений.

В процессе разработки методики, соответствующей требованиям нормативной документации, подобрана оптимальная хроматографическая система и условия детектирования с использованием наиболее интенсивных ионных реакций (таблица 2 и рисунок 3). Количественное определение проводилось путем нормирования площадей пиков методом внутреннего стандарта и полученных линейных зависимостей. Предел количественного определения для малатиона – 0,1 нг/г, для диазинона – 0,01 нг/г сырья. Диапазон линейности калибровочного графика для малатиона – 0,1–100, диазинона – 0,01–10 нг/г.

Результаты определения содержания малатиона и диазинона и статистическая обработка представлены в таблице 3.

Распределение малатиона и диазинона в ноготках лекарственных

Как следует из данных, представленных в таблице 3, этап I, малатион и диазинон обнаруживаются во всех анализируемых частях *ноготков лекарственных*. Наиболее высокое содержание ФОП обнаружено в корнях, и можно отметить, что это самые высокие значения содержания ФОП по сравнению с содержанием в двух других модельных растениях. В образцах из группы 1 содержание малатиона в корнях ноготков составило 16,7 мг/кг сырья, что более чем в 16 раз превышает предел допустимого содержания, определенный соответствующей ОФС ГФ РФ XV (1,0 мг/кг малатиона в сумме с малаоксоном) [2]. При обработке ЛР трехкратно более высоким количеством ФОП (группа 2) содержание малатиона в корнях ноготков увеличивается примерно в три раза (53,1 мг/кг), а в олиственных побегах – даже в 4.4 раза. Наименьшее содержание малатиона обнаружено в цветках, для группы 1 эти значения ниже регламентируемого предела допустимого содержания.

Диазинон был найден в образцах группы 1 в количестве 19,6 мг/кг в корнях и 1,4 мг/кг сырья в олиственных побегах (предел допустимого содержания для диазинона – 0,5 мг/кг сырья) [2]. В образцах группы 2 отмечены те же закономерности увеличения концентраций во всех частях растения. В отличие от представленных значений содержание диа-

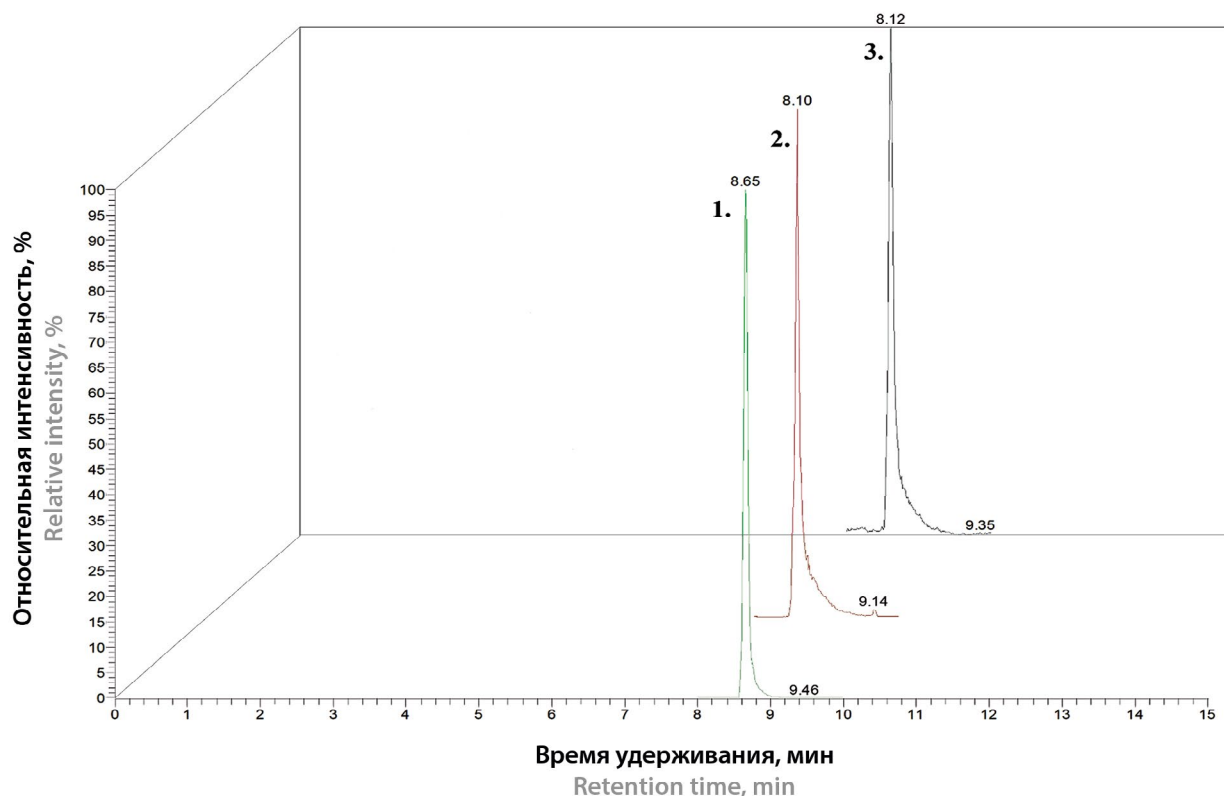


Рисунок 3. Суперпозиция хроматограмм 100 нг/мл диазинона, малатиона и малатиона-d6 в корневищах с корнями валерианы (группа 1):

1 – ионная реакция для определения содержания диазинона: 305,1083 => 169,0794; 2 – ионная реакция для определения содержания малатиона-d6: 337,081 => 291,0391; 3 – ионная реакция для определения содержания малатиона: 331,0433 => 285,0015

Figure 3. Superposition of chromatograms of 100 ng/ml diazinon, malathion, and malathion-d6 in rhizomes with valerian roots (group 1):

1 – ionic reaction to determine diazinon content: 305.1083 => 169.0794; 2 – ionic reaction to determine the content of malathion-d6: 337.081 => 291.0391; 3 – ionic reaction to determine the malathion content: 331.0433 => 285.0015

зинона в цветках ноготков, являющихся ЛРС, значительно ниже (0,079 мг/кг сырья в образцах из группы 1 и 0,1 мг/кг из группы 2) и эти количества не превышают нормируемый допустимый предел. Можно предположить, что значительное распределение малатиона и диазинона во всех частях ноготков лекарственных связано с тем, что ноготки обрабатывались пестицидами во время ювенильного этапа развития растения, когда происходило активное накопление вегетативной массы и интенсивная работа корневой системы.

Распределение малатиона и диазинона в крапиве двудомной

В отличие от ноготков лекарственных такого же характерного распределения ФОП по частям растения не наблюдается. Содержание малатиона и диазинона в стеблях крапивы ниже предела количественного определения. Листья крапивы двудомной, используемые в фармацевтической промышленности

и в бытовой кулинарии, содержали малатион в пределах допустимого содержания (как в образцах группы 1, так и группы 2, таблица 3). И только в корнях крапивы наблюдается наличие обоих пестицидов в количествах, значительно превышающих пределы допустимого содержания.

Распределение малатиона и диазинона в валериане лекарственной

В корневищах с корнями валерианы лекарственной, являющихся ЛРС, в образцах группы 1 и малатион (1,7 мг/кг), и диазинон (1,5 мг/кг) обнаружены в количествах, превышающих предел допустимого содержания, и наблюдается трех- и четырехкратное превышение этих количеств в образцах группы 2. В то же время можно отметить, что по сравнению с содержанием ФОП в подземных частях ноготков лекарственных и крапивы двудомной у валерианы лекарственной зафиксировано наименьшее накопление обоих пестицидов в подземных органах.

Таблица 3. Содержание малатиона и диазинона в образцах ЛРС ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной
Table 3. Containing of malathion and diazinon in samples of the herbal plant of marigold, stinging nettle, and valerian

Образец ЛРС Sample of herbal plants		Малатион Malathion				Диазинон Diazinon							
		I этап Stage I		II этап Stage II		I этап Stage I		II этап Stage II					
		Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %	Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %	Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %			
Ноготки лекарственные (Calendula officinalis) Marigold (Calendula officinalis)													
Цветки Flowers	1	0,73	0,065	8,83	0,086	0,001	1,2	0,079	0,001	8,3	следовые количества trace quantities		
	2	1,34	0,085	6,29	0,092	0,0011	1,3	0,1	0,008	7,4	следовые количества trace quantities		
	3	не обнаружено not detected			не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected				
Олиственные побеги Leafy shoots	1	1,01	0,10	9,55	0,53	0,021	3,9	1,42	0,1	8,2	1,14	0,012	0,84
	2	4,42	0,35	7,84	1,84	0,018	0,97	3,96	0,08	2,4	3,12	0,042	1,07
Корни Roots	1	16,68	1,00	6,01	13,1	1,14	8,7	19,6	2,0	14,8	13,4	0,43	2,2
	2	53,1	3,51	6,61	29,8	0,62	2,1	51,6	5,4	10,4	31,5	0,49	1,19
Крапива двудомная (Urtica dioica) Stinging nettle (Urtica dioica)													
Стебли Stems	1	следовые количества trace quantities			следовые количества trace quantities			0,026	0,002	8,0	0,019	0,00049	0,53
	2	следовые количества trace quantities			следовые количества trace quantities			0,037	0,003	9,8	0,029	0,00065	1,1
Листья Leaves	1	0,072	0,008	10,6	следовые количества trace quantities			0,014	0,002	11,5	0,011	0,007	1,2
	2	0,15	0,006	5,5	0,11	0,0016	1,1	0,043	0,004	10,5	0,031	0,001	0,7
Корни Roots	1	4,52	0,29	6,3	2,94	0,12	4,2	4,1	0,41	10,1	2,71	0,02	0,58
	2	8,29	0,66	8,0	3,2	0,11	3,7	6,68	0,55	8,3	3,76	0,071	1,9
	3	не обнаружено not detected			не обнаружено not detected			не обнаружено not detected		не обнаружено not detected			

Окончание таблицы 3

Образец ЛРС Sample of herbal plants	Группа Group	Малатион Malathion				Диазинон Diazinon							
		I этап Stage I		II этап Stage II		I этап Stage I		II этап Stage II					
		Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %	Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %	Содержание, мг/кг Containing, mg/kg	SD, мг/кг SD, mg/kg	RSD, %			
		Валериана лекарственная Valerian (Valeriana officinalis)											
Олиственные побеги Leafy shoots	1	0,0065	0,0018	27,8	0,0015	0,00087	16,8	0,042	0,0073	15,4	1,25	0,022	1,4
	2	0,026	0,004	15,3	0,016	0,00084	6,1	0,083	0,0009	10,6	4,33	0,051	0,42
	3	не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected	
Корневища с корнями Rhizomes with roots	1	1,70	0,11	6,7	1,32	0,033	2,5	1,54	0,25	16,4	1,25	0,022	1,4
	2	4,09	0,42	10,2	2,58	0,031	1,2	6,63	0,07	1,1	4,33	0,051	0,42
	3	не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected		не обнаружено not detected	

В посевах крапивы двудомной и валерианы лекарственной пестицидами обрабатывалась молодая растения. Они уже не находились на активном этапе роста, с чем, скорее всего, связано меньшее содержание малатиона и диазинона в корнях. Присутствие незначительных количеств пестицидов в наземных частях растений, стеблях, листьях и олиственных побегах (см. таблица 3) говорит о том, что некоторое распределение и накопление в тканях тем не менее происходит.

Персистентность малатиона и диазинона

Одна из задач настоящей работы состояла в оценке персистентности малатиона и диазинона в процессе полугодового хранения лекарственного сырья в соответствии с указанными выше условиями (этап II). По литературным сведениям, малатион и диазинон быстро подвергаются химическому и ферментному разложению и испарению с поверхности обработанных растений [4]. В тканях растений данные ФОП гидролизуются фосфатазами и карбоксиэстеразами с образованием малотоксичных соединений [10]. На данный момент малоизучены способности ФОП депонироваться вследствие взаимодействия с биологически активными веществами (БАВ), содержащимися в различных тканях растений. Высокие концентрации малатиона и диазинона, полученные в настоящем анализе, могут, предпо-

жительно, объясняться наличием в тканях ноготков, крапивы и валерианы БАВ, влияющих на персистентность исследуемых пестицидов.

На рисунке 4 представлены совокупные данные по содержанию малатиона и диазинона на I и II этапах анализа одних и тех же образцов. Содержание малатиона и диазинона уменьшилось во всех анализируемых частях каждого из трех растений. За исключением содержания малатиона в олиственных побегах валерианы и содержания диазинона в стеблях крапивы, разница в содержании пестицидов сильнее видна у тех экспериментальных образцов, которые были обработаны трехкратно большим количеством пестицидов (группа 2) по сравнению с рекомендованными производителями дозами.

В подземных органах анализируемых растений разложение диазинона и малатиона в течение 0,5 года хранения сухого сырья происходит с различной скоростью (рисунки 5 и 6). Обращает на себя внимание, что персистентность каждого из двух пестицидов имеет разную тенденцию в зависимости от вида растения. В образцах группы 1 в корнях ноготков лекарственных наблюдались большая убыль диазинона, чем малатиона, уменьшение содержания в корнях крапивы и в корневищах с корнями валерианы примерно одинаково. В образцах группы 2 в корнях крапивы быстрее происходило разложение малатиона, чем диазинона, и эта тенденция в

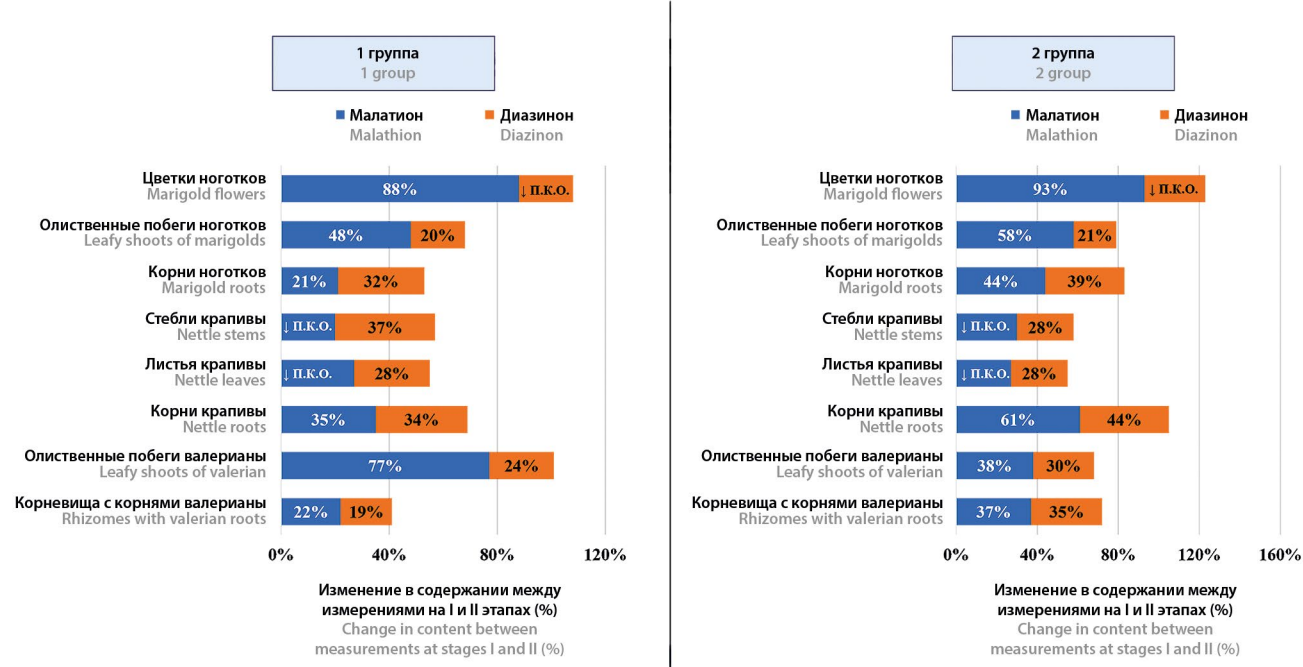


Рисунок 4. Относительное содержание малатиона и диазинона в морфологических частях ЛРС через 6 месяцев хранения (количество малатиона и диазинона в образцах, измеренных в октябре, принято за 100 %, в апреле – представлено на рисунке)

Figure 4. The relative content of malathion and diazinon in the morphological parts of the herbal plant after 6 months of storage (the amounts of malathion and diazinon in samples measured in April are shown in the figure, and the results of October's measurement are taken as 100 %)

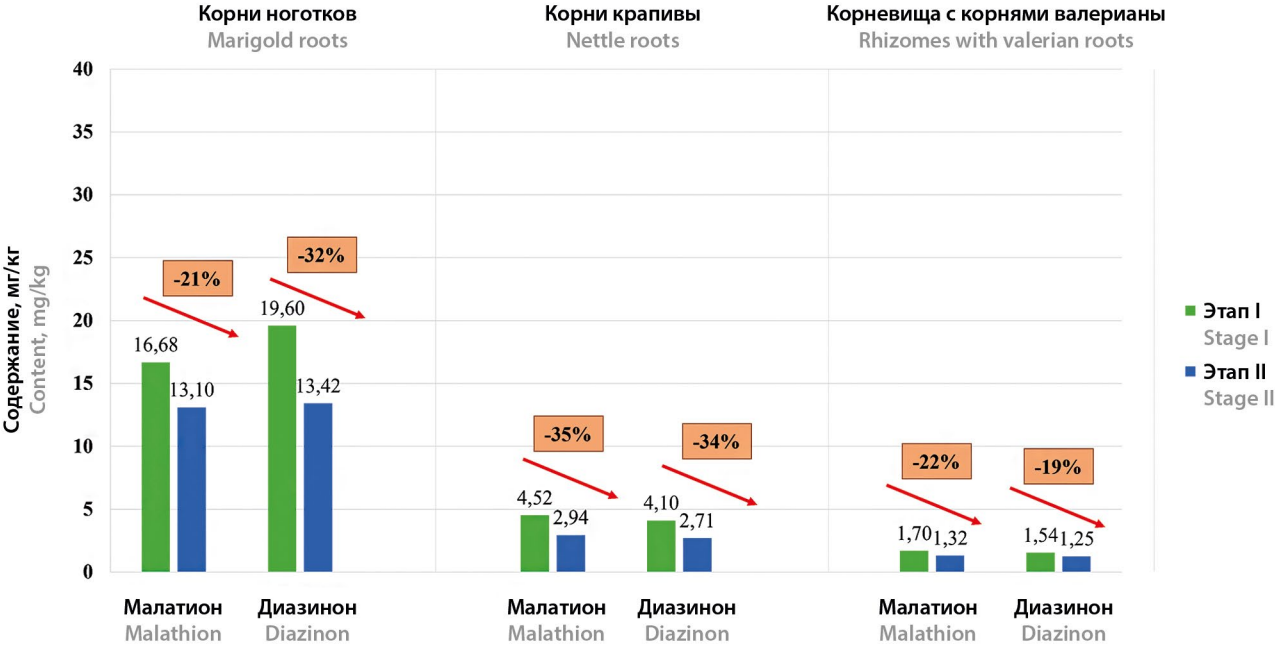


Рисунок 5. Персистентность малатиона и диазинона в подземных органах растений (группа 1)

Figure 5. Persistence of malathion and diazinon in underground plant organs (group 1)

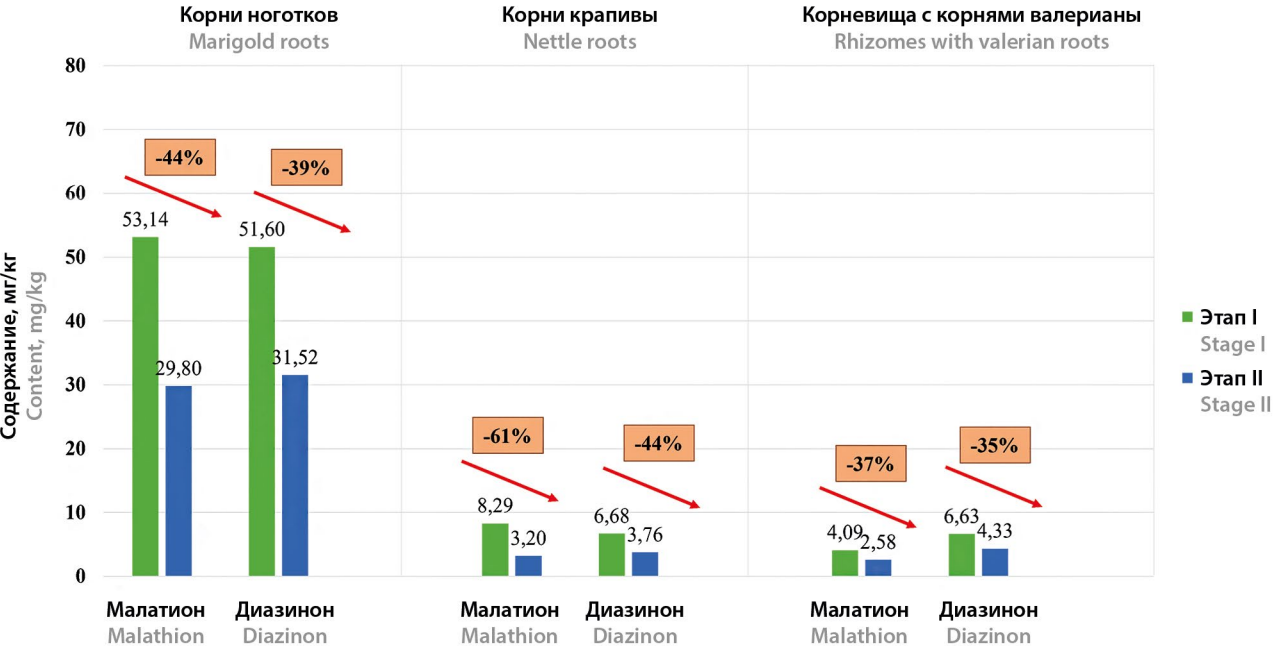


Рисунок 6. Персистентность малатиона и диазинона в подземных органах растений (группа 2)

Figure 6. Persistence of malathion and diazinon in underground plant organs (group 2)

меньшей степени наблюдалась и для остальных видов РС. Важно отметить, что содержание пестицидов, проанализированное на этапе II исследования, превышало предел допустимого содержания для всех подземных частей растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что ФОП диазинон и малатион при внесении в почву способны проникать в ткани растений валерианы лекарственной, ноготков лекарственных и крапивы двудомной и распределяться по

частям растения. Основное накопление данных пестицидов происходит в подземных частях растений (корни, корневища с корнями), а при внесении количеств пестицидов, рекомендованных производителем, содержание малатиона и диазинона может превышать определенные ГФ РФ XV пределы допустимого содержания в ЛРС.

Вегетативный период растений, вероятно, влияет на интенсивность всасывания пестицидов растениями. Так, в корнях ноготков, обработанных пестицидами во время ювенильного этапа развития растения, было обнаружено значительно большее содержание малатиона и диазинона, чем в корнях крапивы или корневищах с корнями валерианы лекарственной. Это обстоятельство следует учитывать при планировании сроков обработки растений ФОП.

Результаты анализа, полученные на основе экспериментов с трехкратным превышением рекомендуемой производителем нормы внесения, демонстрируют повышение содержания пестицидов в ЛРС. Повышение имеет определенную вариабельность. Содержание малатиона в различных частях ноготков лекарственных, крапивы двудомной и валерианы лекарственной увеличилось в интервале от 1,8 до 3,2 раза, диазинона – от 1,6 до 9,4 раза.

Исследование персистентности данных ФОП посредством повторных анализов через 0,5 года тех же образцов высушенного сырья свидетельствует о том, что малатион и диазинон способны сохраняться в тканях растений в течение длительного времени. Для диазинона в большинстве случаев отмечается меньшая убыль в процентном соотношении при хранении в сравнении с малатионом, что может говорить о его большей устойчивости к деградации.

В качестве маркерного объекта для анализа соответствия содержания пестицидов нормативным требованиям можно рекомендовать корни крапивы двудомной, которая для этой цели может высаживаться наряду с культивируемыми растениями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цицилин А. Н., Ковалев Н. И. Лекарственное растениеводство России в XXI веке (вызовы и перспективы развития). *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2021;(1):42–54. DOI: 10.26897/0021-342X-2021-1-42-54.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 2. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2023.
3. Фатеенкова О. В., Савватеев А. М., Белобородов В. Л., Гравель И. В. Нормирование остаточных фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):137–151. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-137-151.

4. Зинченко В. А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. М.: КолосС; 2005. 232 с.
5. Медовар А. М. Стойкость фосфорорганических пестицидов во внешней среде. *Гигиена и санитария*. 1971;10:78–82.
6. Organophosphorus insecticides: a general introduction. Geneva: World Health Organization; 1986. 135 p.
7. Майер-Боден Г.; Мельникова Н. Н., перевод с немецкого. Остатки пестицидов. Инсектициды. М.: Мир; 1966. 252 с.
8. Chaudhry G. R., Ali A. N., Wheeler W. B. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54(2):288–293. DOI: 10.1128/aem.54.2.288-293.1988.
9. Mulbry W. W., Karns J. S. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium* opd gene: relationship between the gene and protein. *Journal of Bacteriology*. 1989;171(12):6740–6746. DOI: 10.1128/jb.171.12.6740-6746.1989.
10. Ганиев М. М., Недорезков В. Д. Химические средства защиты растений. М.: КолосС; 2006. 248 с.
11. Lalah J. O., Wandiga S. O. The Persistence and Fate of Malathion Residues in Stored Beans (*Phaseolus vulgaris*) and Maize (*Zea mays*). *Pesticide Science*. 1996;46(3):215–220. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199603)46:3<215::AID-PS341>3.0.CO;2-L.
12. Dogheim S. M., Ashraf E. M. M., Alla S. A. G., Khorshid M. A., Fahmy S. M. Pesticides and heavy metals levels in Egyptian leafy vegetables and some aromatic medicinal plants. *Food Additives & Contaminants*. 2004;21(4):323–330. DOI: 10.1080/02652030310001656361.
13. Sarkhail P., Yunesian M., Ahmadvhaniha R., Sarkheil P., Rastkari N. Levels of organophosphorus pesticides in medicinal plants commonly consumed in Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;20(1):9. DOI: 10.1186/2008-2231-20-9.
14. Крылов В. И., Яшкир В. А., Браун А. В., Крылов И. И., Фатеенкова О. В., Савватеев А. М. Разработка методов синтеза малатиона-Д6, хлорофоса-Д6 и ди-хлорофоса-Д6 для использования в качестве внутренних стандартов при анализе лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(3):411–418. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-517.
15. Попов А. И., Шпанько Д. Н. Широкие возможности применения валерианы лекарственной в медицинской практике. *Медицина в Кузбассе*. 2023;2:17–22.

REFERENCES

1. Tsitsilin A. N., Kovalev N. I. Medicinal plant production in Russia in the 21st century (challenges and development prospects). *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2021;(1):42–54. (In Russ.) DOI: 10.26897/0021-342X-2021-1-42-54.
2. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XV ed. V. 2. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2023. (In Russ.)
3. Fateenkova O. V., Savvateev A. M., Beloborodov V. L., Gravel I. V. Rationing of Residual Organophosphate Pesticides in Herbal Substances (Review). *Drug develop-*

- ment & registration. 2022;11(3):137–151. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-137-151.
4. Zinchenko V. A. Chemical plant protection: means, technology and environmental safety. Moscow: KolosS; 2005. 232 p. (In Russ.)
 5. Medovar A. M. Persistence of organophosphorus pesticides in the external environment. *Hygiene and sanitation*. 1971;10:78–82. (In Russ.)
 6. Organophosphorus insecticides: a general introduction. Geneva: World Health Organization; 1986. 135 p.
 7. Mayer-Bode G.; Melnikova N. N., translation from German. Pesticide residues. Insecticides. Moscow: Mir; 1966. 252 p. (In Russ.)
 8. Chaudhry G. R., Ali A. N., Wheeler W. B. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54(2):288–293. DOI: 10.1128/aem.54.2.288-293.1988.
 9. Mulbry W. W., Karns J. S. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium* opd gene: relationship between the gene and protein. *Journal of Bacteriology*. 1989;171(12):6740–6746. DOI: 10.1128/jb.171.12.6740-6746.1989.
 10. Ganiev M. M., Nedorezkov V. D. Chemical plant protection products. Moscow: KolosS; 2006. 248 p. (In Russ.)
 11. Lalah J. O., Wandiga S. O. The Persistence and Fate of Malathion Residues in Stored Beans (*Phaseolus vulgaris*) and Maize (*Zea mays*). *Pesticide Science*. 1996;46(3):215–220. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199603)46:3<215::AID-PS341>3.0.CO;2-L.
 12. Dogheim S. M., Ashraf E. M. M., Alla S. A. G., Khorshid M. A., Fahmy S. M. Pesticides and heavy metals levels in Egyptian leafy vegetables and some aromatic medicinal plants. *Food Additives & Contaminants*. 2004;21(4):323–330. DOI: 10.1080/02652030310001656361.
 13. Sarkhail P., Yunesian M., Ahmadvhaniha R., Sarkheil P., Rastkari N. Levels of organophosphorus pesticides in medicinal plants commonly consumed in Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;20(1):9. DOI: 10.1186/2008-2231-20-9.
 14. Krylov V. I., Yashkir V. A., Braun A. V., Krylov I. I., Fateenkova O. V., Savvateev A. M. Development of Methods for the Synthesis of Malathion-D6, Chlorophos-D6, and Dichlorophos-D6 for Use as Internal Standards in the Analysis of Medicinal Plant Raw Materials and Herbal Medicinal Products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(3):411–418. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2023-517.
 15. Popov A. I., Shpanko D. N. Wide possibilities of using medicinal valerian in medical practice. *Medicine in Kuzbass*. 2023;2:17–22. (In Russ.)



Разработка и валидация методики количественного определения субстанции аморфного дарунавира методом УФ-спектрофотометрии

М. А. Мандрик^{1,2✉}, И. А. Садковский^{1,2}, Е. Д. Пинегина¹, Л. А. Король¹, И. И. Краснюк¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН). 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 29

✉ Контактное лицо: Мандрик Марк Александрович. E-mail: mandrik_m_a@staff.sechenov.ru

ORCID: М. А. Мандрик – <https://orcid.org/0000-0002-3558-9615>;
И. А. Садковский – <https://orcid.org/0000-0001-8375-9909>;
Е. Д. Пинегина – <https://orcid.org/0009-0001-7890-0821>;
Л. А. Король – <https://orcid.org/0000-0001-5919-1866>;
И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 14.02.2024

Статья принята в печать: 05.08.2024

Статья опубликована: 09.08.2024

Резюме

Введение. Дарунавир, являясь эффективным средством антиретровирусной терапии, широко применяется в клинической практике, в том числе для лечения педиатрических пациентов и беременных женщин, а также в качестве инструмента персонализированной терапии. При этом в производстве готовых лекарственных форм в настоящее время используется дарунавир как в виде кристаллического этанолат, так и в форме аморфной субстанции. В связи с этим существует потребность в разработке и совершенствовании методов количественного определения дарунавира. В качестве недорогой и эффективной альтернативы распространенным хроматографическим и титриметрическим методам может быть использовано спектрофотометрическое определение дарунавира в ультрафиолетовой области спектра (УФ-спектрофотометрия).

Цель. Разработать и валидировать методику количественного определения аморфного дарунавира в субстанции методом УФ-спектрофотометрии.

Материалы и методы. Для исследования использовали следующие субстанции и расходные материалы: субстанцию-порошок дарунавира аморфного (USP); стандартный образец дарунавира (MSN Pharmachem Pvt. Ltd., Индия); метанол, класс «ос.ч.», для градиентной ВЭЖХ 99,9 %; ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ 99,9 %; уксусная кислота (ледяная) для ВЭЖХ; 0,1 моль/л раствор хлорной кислоты в безводной уксусной кислоте для титрования в неводных средах; нейлоновые шприцевые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Спектрофотометрическое определение дарунавира проводили, используя спектрофотометр Cary 60 (Agilent Technologies, США) и спектрофотометр UNICO 2800 (United Products & Instruments, Inc., США). Для изготовления стандартных растворов использовали весы аналитические Analytical Balance MS105/A (METTLER TOLEDO, Швейцария), весы аналитические GH-120 (AND, Япония), мерную посуду класса А, градуированные пипетки ISOLAB.

Результаты и обсуждение. Методика была разработана и валидирована по следующим характеристикам: специфичности, линейности, правильности, прецизионности, аналитической области. По результатам исследования основные валидационные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости.

Закключение. Была проведена успешная разработка и валидация новой методики количественного определения аморфного дарунавира методом УФ-спектрофотометрии. Методика может быть использована для проведения контроля качества субстанций, действующим веществом которых является аморфный дарунавир, в том числе для внутриаптечного контроля.

Ключевые слова: аморфный дарунавир, УФ-спектрофотометрия, валидация, специфичность, линейность

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

Вклад авторов. М. А. Мандрик, И. А. Садковский, Е. Д. Пинегина – дизайн исследования, проведение экспериментов, статистическая обработка результатов, написание и редактирование статьи. В рецензировании и одобрении результатов участвовали Л. А. Король и И. И. Краснюк. Все соавторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Мандрик М. А., Садковский И. А., Пинегина Е. Д., Король Л. А., Краснюк И. И. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции аморфного дарунавир методом УФ-спектрофотометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):117–125. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1749>

Development and validation of UV-spectrophotometry method for quantitative determination of amorphous darunavir

Mark A. Mandrik^{1,2}✉, Ivan A. Sadkovskii^{1,2}, Elizaveta D. Pinegina¹,
Ludmila A. Korol¹, Ivan I. Krasnuk¹

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

² A. V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, RAS (TIPS RAS). 29, Leninsky Prospekt, Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Mark A. Mandrik. **E-mail:** mandrik_m_a@staff.sechenov.ru

ORCID: Mark A. Mandrik – <https://orcid.org/0000-0002-3558-9615>;
Ivan A. Sadkovskii – <https://orcid.org/0000-0001-8375-9909>;
Elizaveta D. Pinegina – <https://orcid.org/0009-0001-7890-0821>;
Ludmila A. Korol – <https://orcid.org/0000-0001-5919-1866>;
Ivan I. Krasnuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 14.02.2024

Accepted: 05.08.2024

Published: 09.08.2024

Abstract

Introduction. Darunavir as an effective antiretroviral drug is widely used in clinical practice, including for the treatment of pediatric patients, as well as pregnant women, and for personalized therapy. Currently darunavir is used in the production of finished dosage forms, both in the form of crystalline ethanolate and in the form of an amorphous substance. In this regard, there is a need to develop and improve methods for the quantitative determination of darunavir. As an inexpensive and effective alternative to common chromatographic and titrimetric methods, spectrophotometric determination of darunavir in the ultraviolet region of the spectrum (UV spectrophotometry) may be used.

Aim. To develop and validate a method for the quantitative determination of amorphous darunavir in the substance by UV spectrophotometry.

Materials and methods. The following substances and consumables were used for the research: powdered amorphous darunavir substance (USP); darunavir reference standard (MSN Pharmachem Pvt. Ltd., India); methanol for HPLC Gradient Grade 99.9 % (High purity); acetonitrile for HPLC Gradient Grade 99.9 %; glacial acetic acid for HPLC; 0.1 M perchloric acid solution (in anhydrous acetic acid) for titration in non-aqueous media; nylon syringe filters with a pore diameter of 0.22 microns. Spectrophotometric determination of darunavir was carried out using an Cary 60 spectrophotometer (Agilent Technologies, USA) and a UNICO 2800 spectrophotometer (United Products & Instruments, Inc., USA). To prepare standard solutions, we used analytical balance Analytical Balance MS105/A (METTLER TOLEDO, Switzerland), analytical balance GH-120 (AND, Japan) class A measuring glassware, graduated pipettes ISOLAB.

Results and discussion. The method was developed and validated for the following characteristics: specificity, linearity, accuracy, precision, analytical range. According to the study results, the main validation characteristics of the method meet the acceptance criteria.

Conclusion. A new method for the quantitative determination of amorphous darunavir by UV spectrophotometry was successfully developed and validated. The method may be used to control the quality of substances of amorphous darunavir, including the intrapharmaceutical control.

Keywords: amorphous darunavir, UV spectrophotometry, validation, specificity, linearity

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. Mark A. Mandrik, Ivan A. Sadkovskii, Elizaveta D. Pinegina – research design, carrying out the experiments, statistical processing of results, manuscript writing and editing. Ludmila A. Korol and Ivan I. Krasnuk participated in the review and approval of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Mandrik M. A., Sadkovskii I. A., Pinegina E. D., Korol L. A., Krasnuk I. I. Development and validation of UV-spectrophotometry method for quantitative determination of amorphous darunavir. *Drug development & registration*. 2024;13(3):117–125. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1749>

ВВЕДЕНИЕ

Дарунавир ((3R,3aS,6aR)-гексагидрофурано[2,3-b]фуран-3-ил)(N-((2S,3R)-4-[4-амино-N-(2-метилпропил)бензолсульфонамидо]-3-гидрокси-1-фенилбутан-2-ил}карбамат) – непептидное соединение из класса синтетических ингибиторов протеаз, широко применяемое в качестве средства антиретровирусной терапии пациентов с вирусом иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) [1]. Механизм действия дарунавир основан на ингибировании аспарагиновой протеазы ВИЧ-1, что препятствует расщеплению вирусных Gal-Pol-полипротеинов на функциональные фрагменты в инфицированных клетках, тем самым предотвращая образование зрелых вирусных частиц [2]. Дарунавир демонстрирует высокую эффективность в отношении ВИЧ дикого типа [3], а также является важным компонентом комбинированной антиретровирусной терапии, при которой назначается совместно с другими антиретровирусными препаратами [4], в том числе детям [5] и беременным женщинам [6]. Этому способствует ряд его особенностей, таких как уникально высокая прочность связывания с активным центром вирусной протеазы и длительное время диссоциации образовавшегося комплекса [7]. Кроме того, благодаря гибкой структуре молекулы дарунавир демонстрирует широкую специфичность в отношении мутировавших и высокорезистентных протеаз, вследствие чего остается эффективным против штаммов ВИЧ, устойчивых к другим препаратам этого класса [8]. При этом возникает вариабельность эффективных терапевтических концентраций среди различных категорий пациентов: так, для ранее не получавших терапию целевые значения концентрации дарунавир в плазме крови в 10 раз меньше, чем для ранее получавших, что делает его перспективным инструментом персонализированной терапии ВИЧ-инфекции [9].

Одной из характерных особенностей дарунавир является псевдополиморфное поведение (сольватоморфизм) – способность образовывать молекулярные комплексы (сольваты), содержащие в кристаллической решетке как молекулы самого вещества, так и молекулы различных растворителей [10, 11] и обладающие различными физико-химическими свойствами. В качестве активной фармацевтической субстанции (АФС) в первом зарегистрированном препарате дарунавир использовался дарунавир этанолат, однако в настоящее время наряду с кристаллическим этанолатом в фармацевтическом производстве используется и несольватированная аморфная форма дарунавир, обладающая лучшей растворимостью [10].

В связи с широким использованием обеих форм дарунавир в фармацевтическом производстве, а также перспективностью его применения для изготовления персонализированных лекарственных форм аптечными организациями высокую актуальность приобретает разработка простых, дешевых и

быстрых аналитических методов количественного определения этого вещества в целях контроля качества как субстанции, так и готовых лекарственных форм.

В настоящее время основным методом количественного определения дарунавир как в субстанции, так и в готовых лекарственных формах является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В частности, метод ВЭЖХ предлагается для количественного определения дарунавир и дарунавир этанолата Государственной фармакопеей XV издания. Подробно некоторые методики хроматографического определения дарунавир описаны в исследовательских работах [12–14], а также в соответствующих фармакопейных статьях^{1, 2}. И хотя метод характеризуется очевидными достоинствами, такими как точность и высокая чувствительность, а также возможностью его использования для оценки стабильности лекарственных препаратов [15] или контроля содержания примесей [16], высокая стоимость оборудования и реактивов является существенным недостатком ВЭЖХ, ограничивающим ее повсеместное применение [17].

Альтернативным фармакопейным методом количественного определения дарунавир является потенциометрическое титрование в среде безводной уксусной кислоты. Метод является абсолютным, однако обладает рядом недостатков: низкой чувствительностью и специфичностью.

Прочие известные методы включают в себя определение дарунавир этанолата в таблетках посредством инфракрасной спектроскопии [18], капиллярного электрофореза [19] и высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) [20], а также УФ-спектрофотометрии.

Спектрофотометрия может рассматриваться в качестве альтернативного метода, обладающего относительно высокой чувствительностью и не требующего значительных затрат времени, а также использования дорогого оборудования и реагентов. В научной литературе описаны разработка и валидация ряда методик, подразумевающих прямое спектрофотометрическое определение дарунавир этанолата с использованием метанола [21] или 0,1 М раствора HCl [22] в качестве среды растворения, а также методик, основанных на дериватизации этанолата дарунавир с последующим колориметрическим определением [23–25]. Однако описания валидированной методики УФ-спектрофотометрического определения дарунавир в тех случаях, когда субстанция является не кристаллическим этанолатом, а аморфным порошком, обнаружено не было, что

¹ ФС.2.1.0402. «Дарунавир». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-1/darunavir/> Ссылка активна на 14.02.2024.

² ФС.2.1.0403. «Дарунавир этанолат». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-1/darunavira-etanolat/> Ссылка активна на 14.02.2024.

делает разработку и валидацию такой методики актуальной задачей.

Таким образом, **целью данного исследования** является разработка и валидация методики количественного определения аморфного дарунавира в субстанции методом УФ-спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и расходные материалы

В качестве исследуемого соединения были взяты субстанция-порошок дарунавира аморфного (USP) и стандартный образец дарунавира производства MSN Pharmachem Pvt. Ltd. (Индия). Также для проведения исследования были использованы: метанол «ос.ч.» для градиентной ВЭЖХ 99,9%; ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ 99,9%; уксусная кислота (ледяная) для ВЭЖХ; 0,1 моль/л раствор хлорной кислоты в безводной уксусной кислоте для титрования в неводных средах; нейлоновые шприцевые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Приборы и оборудование

Спектрофотометр Cary 60 (Agilent Technologies, США), спектрофотометр UNICO 2800 (United Products & Instruments, Inc., США), титратор Compact G10S (METTLER TOLEDO, Швейцария); весы аналитические Analytical Balance MS105/A (METTLER TOLEDO, Швейцария), весы аналитические GH-120 (AND, Япония), мерная посуда класса А, градуированные пипетки ISOLAB.

Приготовление стандартных растворов

Для приготовления исходных стандартных растворов около 50 мг дарунавира (точная навеска) растворяли в мерной колбе вместимостью 100 мл, используя метанол в качестве среды растворения. Содержимое колбы перемешивали до полного растворения навески, объем раствора доводили метанолом. Концентрация полученного раствора составила 0,5 мг/мл (раствор А). 2,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу объемом 50 мл, объем раствора доводили до метки метанолом, плотно закупоривали, перемешивали. Концентрация полученного раствора составила 20 мкг/мл (раствор Б).

Стандартные растворы готовили путем разведения растворов А и Б (таблица 1). Необходимый объем отбирали с помощью градуированных стеклянных пипеток.

Каждую отобранную пробу перед измерением профильтровывали через нейлоновый шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Оптическую плотность образцов стандартных растворов измеряли на спектрофотометре в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 268 нм, используя в качестве раствора сравнения чистый метанол.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методика была валидирована в соответствии с ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ XV по следующим характеристикам: специфичности, линейности, правильности, прецизионности (на двух уровнях: сходимости, межлабораторная прецизионность), аналитической области. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС 1.1.0013. «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» ГФ XV.

Таблица 1. Стандартные растворы аморфного дарунавира

Table 1. Standard solutions of amorphous darunavir

Концентрация раствора аморфного дарунавира, мкг/мл Concentration of amorphous darunavir solution, mcg/ml	Количество компонента, мл Amount of component, ml	
	Исходный стандартный раствор аморфного дарунавира Stock solution of amorphous darunavir	Метанол Methanol
2	1 мл (раствор Б) 1 ml (solution B)	до 10 up to 10
4	5 мл (раствор Б) 5 ml (solution B)	до 25 up to 25
6,4	8 мл (раствор Б) 8 ml (solution B)	до 25 up to 25
8	4 мл (раствор Б) 4 ml (solution B)	до 10 up to 10
10	5 мл (раствор Б) 5 ml (solution B)	до 10 up to 10
13	6,5 мл (раствор Б) 6.5 ml (solution B)	до 10 up to 10
15	7,5 мл (раствор Б) 7.5 ml (solution B)	до 10 up to 10
18	9 мл (раствор Б) 9 ml (solution B)	до 10 up to 10
20	10 мл (раствор Б исходный) 10 ml (solution B initial)	не добавляли not added
22	1,1 мл (раствор А) 1.1 ml (solution A)	до 25 up to 25
25	2,5 мл (раствор А) 2.5 ml (solution A)	до 50 up to 50

Ранее в работе [26] было показано, что дарунавир стабилен при повышенной температуре, не подвержен окислению в среде пероксида водорода 3 и 6 %, устойчив к воздействию ультрафиолета. При этом в случае кислотного и щелочного гидролиза дарунавир разлагается с образованием различных продуктов деструкции.

Поэтому **специфичность** метода была доказана по совпадению максимумов – (268 ± 2,0 нм) – спектров испытуемого раствора и стандартного раство-

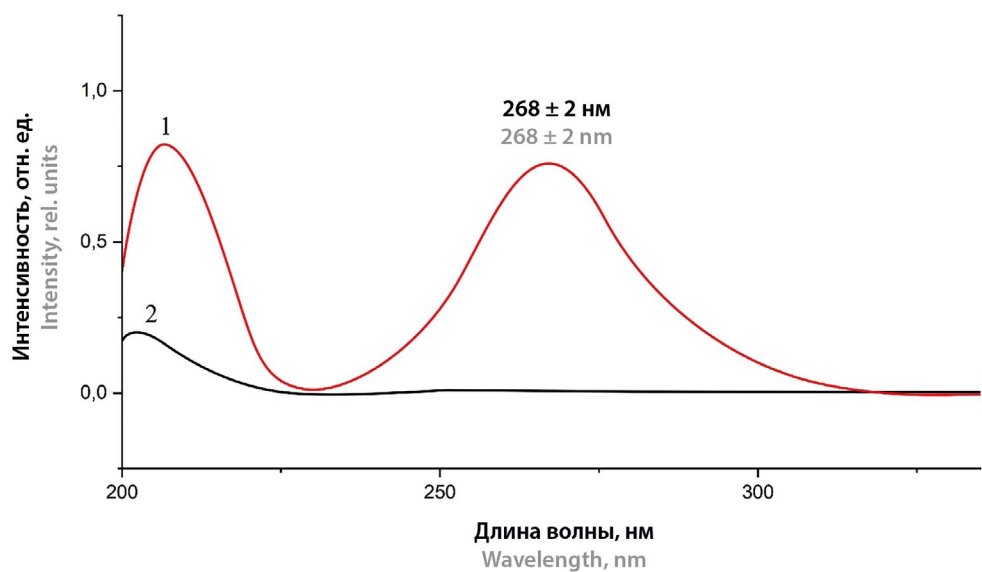


Рисунок 1. УФ-спектры:
1 – стандартный образец дарунавира (20 мкг/мл), 2 – метанол

Figure 1. UV spectra:
1 – darunavir standard sample (20 mcg/ml), 2 – methanol

ра, отсутствию влияния растворителя на результаты спектрофотометрического анализа (рисунок 1), а также путем сравнения результатов испытаний проб, подвергнутых кислотному и щелочному гидролизу, с результатами фармакопейной методики – потенциометрического титрования. Разложение осуществляли в соответствии с методикой, ранее описанной в работе [27], за тем исключением, что как в случае кислотного, так и в случае щелочного гидролиза процесс разложения занимал 48 часов. Титрование проводили в соответствии с ФС.2.1.0402 «Дарунавир» и ОФС.1.2.1.19.0002.15 «Потенциометрическое титрование».

Результаты количественного определения методами титрования и УФ-спектрофотометрии образцов аморфного дарунавира, подвергнутых кислотному и щелочному гидролизу, представлены в таблицах 2 и 3 соответственно.

Сравнение метрологических характеристик использованных методов представлено в таблицах 4 и 5 соответственно.

Для сравнения двух методов количественного определения аморфного дарунавира – потенциометрического титрования и УФ-спектрофотометрии – на равнозначность использовали критерий Фишера. Значения F_1 и F_2 для выборок, полученных в результате количественного определения образцов дарунавира, подвергнутого кислотному и щелочному гидролизу, составили 0,62 и 0,6 соответственно, что в обоих случаях меньше табличного F (99 %, 4,4) = 15,98. Статически достоверное различие величин дисперсий отсутствует. Выборки в обоих случаях равнозначны.

Таблица 2. Количественное определение образцов дарунавира, подвергнутого кислотному гидролизу

Table 2. Quantitative determination of darunavir samples exposed to acid hydrolysis

Взято, г Taken, g	Найдено, г Found value, g	Найдено, % Found value, %	Метрологические характеристики Metrological characteristics
Потенциометрическое титрование Potentiometric titration			
0,3015	0,2586	85,77	$\bar{x}$ = 86,31 % S = 0,93 $S\bar{x}$ = 0,41 $\Delta\bar{x}$ = 1,15 Δx = 2,57 RSD = 1,07 % $\bar{\epsilon}$ = 1,33 % S^2 = 0,86
0,3008	0,2561	85,14	
0,3011	0,2597	86,25	
0,3014	0,2638	87,52	
0,3007	0,2612	86,86	
УФ-спектрофотометрия UV spectrophotometry			
0,301	0,2598	86,31	$\bar{x}$ = 86,43 % S = 0,73 $S\bar{x}$ = 0,33 $\Delta\bar{x}$ = 0,91 Δx = 2,04 RSD = 0,85 % $\bar{\epsilon}$ = 1,05 % S^2 = 0,54
0,3008	0,2604	86,57	
0,3013	0,2582	85,69	
0,3004	0,2583	85,99	
0,3009	0,2636	87,60	

Таблица 3. Количественное определение образцов дарунавира, подвергнутого щелочному гидролизу

Table 3. Quantitative determination of darunavir samples exposed to base hydrolysis

Взято, г Taken, g	Найдено, г Found value, g	Найдено, % Found value, %	Метрологические характеристики Metrological characteristics
Потенциометрическое титрование Potentiometric titration			
0,3009	0,2355	78,27	$\bar{x} = 78,93 \%$ $S = 0,98$ $S\bar{x} = 0,44$ $\Delta\bar{x} = 1,21$ $\Delta x = 2,71$ RSD = 1,24 % $\bar{\epsilon} = 1,54 \%$ $S^2 = 0,95$
0,3012	0,2336	77,56	
0,3011	0,2399	79,67	
0,3002	0,2396	79,81	
0,301	0,2388	79,34	
УФ-спектрофотометрия UV spectrophotometry			
0,3012	0,2377	78,92	$\bar{x} = 78,57 \%$ $S = 0,75$ $S\bar{x} = 0,34$ $\Delta\bar{x} = 0,94$ $\Delta x = 2,09$ RSD = 0,96 % $\bar{\epsilon} = 1,19 \%$ $S^2 = 0,57$
0,3008	0,2351	78,16	
0,3011	0,2389	79,34	
0,3004	0,2327	77,46	
0,3006	0,2374	78,96	

Сравнение средних указанных выборок осуществляли путем вычисления средневзвешенных $S_1 = 0,529$ и $S_2 = 0,574$ для вычисления критерия Стьюдента, ко-

торый составил 0,23 и 0,63 соответственно. Расчетные значения критерия Стьюдента в обоих случаях меньше табличного $t (P = 0,95; 8) = 2,31$, расхождение между средними результатами незначимо.

Линейность методики исследовали, измеряя оптическую плотность 11 образцов стандартных растворов с концентрациями 2, 4, 6,4, 8, 10, 13, 15, 18, 20, 22, 25 мкг/мл, то есть в диапазоне от 10 до 125 % от концентрации дарунавира, принятой за 100 % (20 мкг/мл). По полученным результатам построен калибровочный график (рисунок 2). Коэффициент корреляции составил 0,9996 (более 0,9950) при $y = 0,0385x - 0,0027$, где y – оптическая плотность; x – концентрация (мкг/мл).

Правильность методики была подтверждена результатами анализа стандартных растворов в концентрации 10, 65, 125 % от номинальной. Результаты оценки правильности представлены в таблице 6. Крайние значения результатов отдельных определений (97,79 и 102,34 %) и среднего результата (100,26 %) при $P = 95 \%$ лежат внутри доверительных интервалов результатов отдельного определения $100 \pm 2,98 \%$ и среднего результата $100 \pm 0,77 \%$ соответственно. Относительное стандартное отклонение среднего результата определения (коэффициент вариации) не превышает 2,00 %; относительная погрешность среднего результата – менее 2,00 %.

С целью определения **сходимости методики** количественного определения аморфного дарунавира было приготовлено и проанализировано по 5 образцов каждого из 3 стандартных растворов с концентрацией 2, 13, 25 мкг/мл (10, 32 и 125 % от номинального значения соответственно). Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 4. Данные для статистической обработки средних результатов выборок, полученных в результате количественного определения образцов дарунавира, подвергнутого кислотному гидролизу

Table 4. Data for statistical processing of sample mean obtained as a result of quantitative determination of darunavir samples exposed to acid hydrolysis

Метод Method	n	f	$\bar{x}, \%$	S	$S\bar{x}$	$P_2, \%$	$t(P_2, f)$	Δx	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
Потенциометрическое титрование Potentiometric titration	5	4	86,31	0,93	0,41	95	2,78	2,57	1,15	1,33
УФ-спектрофотометрия UV spectrophotometry	5	4	86,43	0,73	0,33	95	2,78	2,04	0,91	1,05

Таблица 5. Данные для статистической обработки средних результатов выборок, полученных в результате количественного определения образцов дарунавира, подвергнутого щелочному гидролизу

Table 5. Data for statistical processing of sample mean obtained as a result of quantitative determination of darunavir samples exposed to base hydrolysis

Метод Method	n	f	$\bar{x}, \%$	S	$S\bar{x}$	$P_2, \%$	$t(P_2, f)$	Δx	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
Потенциометрическое титрование Potentiometric titration	5	4	78,93	0,98	0,44	95	2,78	2,71	1,21	1,54
УФ-спектрофотометрия UV spectrophotometry	5	4	78,57	0,75	0,34	95	2,78	2,09	0,94	1,19

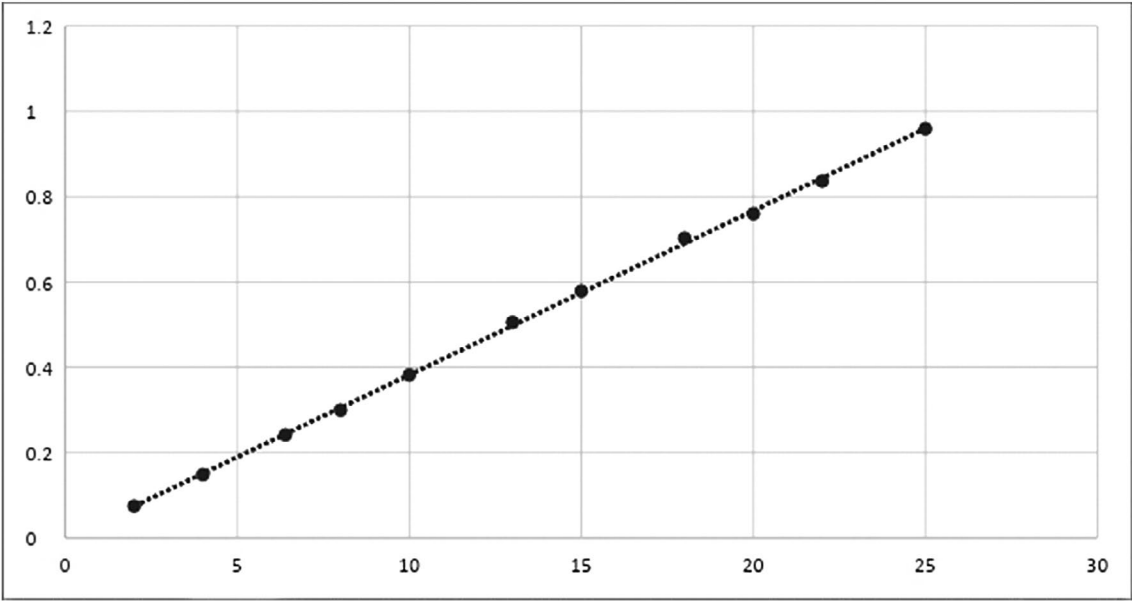


Рисунок 2. Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от концентрации аморфного дарунавира

Figure 2. Graph of linear dependence of optical density (D) of the solution on concentration (C) of amorphous darunavir

Таблица 6. Оценка правильности и сходимости методики

Table 6. Estimation of accuracy and repeatability

$C_{\text{факт.}}, \text{мкг/мл}$ $C_{\text{факт.}}, \text{mcg/ml}$	$C_{\text{рассчит.}}, \text{мкг/мл}$ $C_{\text{calculated}}, \text{mcg/ml}$	Абсолютная погрешность $\Delta X = C_{\text{рассчит.}} - C_{\text{факт.}}$ Absolute error $\Delta X = C_{\text{calculated}} - C_{\text{факт.}}$	Относительная погрешность $\delta = \Delta X \cdot 100 / C_{\text{факт.}} $ Relative error $\delta = \Delta X \cdot 100 / C_{\text{факт.}} $	Найдено, % Value, %	Метрологические характеристики ($P = 95 \%$, $n = 15$) Metrological characteristics ($P = 95 \%$, $n = 15$)
2	1,961	−0,039	−1,948	101,95	$\bar{X} = 100,26 \%$ $S = 1,39$ $S\bar{X} = 0,36$ $\Delta\bar{X} = 0,77$ $\Delta x = 2,99$ $RSD = 1,39 \%$ $\bar{\epsilon} = 0,77 \%$ $S^2 = 1,93$
	2,023	0,023	1,169	98,83	
	1,953	−0,047	−2,338	102,34	
	2,044	0,044	2,208	97,79	
	2,039	0,039	1,948	98,05	
13	12,756	−0,244	−1,878	101,88	
	12,805	−0,195	−1,499	101,50	
	12,829	−0,171	−1,319	101,32	
	12,914	−0,086	−0,659	100,66	
	12,927	−0,073	−0,559	100,56	
25	25,000	0,000	0,000	100,00	
	25,042	0,042	0,166	99,83	
	25,023	0,023	0,094	99,91	
	25,049	0,049	0,197	99,80	
	25,148	0,148	0,592	99,41	

Таблица 7. Оценка сходимости и межлабораторной прецизионности методики

Table 7. Estimation of the repeatability and interlaboratory precision

$C_{\text{факт.}}, \text{мкг/мл}$ $C_{\text{fact}}, \text{mcg/ml}$	$C_{\text{рассчит.}}, \text{мкг/мл}$ $C_{\text{calculated}}, \text{mcg/ml}$	Абсолютная погрешность $\Delta X = C_{\text{рассчит.}} - C_{\text{факт.}}$ Absolute error $\Delta X = C_{\text{calculated}} - C_{\text{fact}}$	Относительная погрешность $\delta = \Delta X \cdot 100 / C_{\text{факт.}} $ Relative error $\delta = \Delta X \cdot 100 / C_{\text{fact}} $	Найдено, % Value, %	Метрологические характеристики ($P = 95 \%, n = 15$) Metrological characteristics ($P = 95 \%, n = 15$)
2	1,984	-0,016	-0,779	100,78	$\bar{x} = 100,05 \%$ $S = 1,17$ $S\bar{x} = 0,3$ $\Delta\bar{x} = 0,65$ $\Delta x = 2,51$ $RSD = 1,17 \%$ $\varepsilon = 0,65 \%$ $S^2 = 1,37$
	1,964	-0,036	-1,818	101,89	
	2,029	0,029	1,429	98,57	
	1,995	-0,005	-0,260	100,26	
	1,961	-0,039	-1,948	101,95	
13	13,047	0,047	0,360	99,64	
	13,244	0,244	1,878	98,12	
	12,984	-0,016	-0,120	100,12	
	13,174	0,174	1,339	98,66	
	13,156	0,156	1,199	98,80	
25	24,745	-0,255	-1,018	101,02	
	25,145	0,145	0,582	99,42	
	24,847	-0,153	-0,613	100,61	
	24,855	-0,145	-0,582	100,58	
	24,935	-0,065	-0,260	100,26	

Для оценки **межлабораторной прецизионности** было проведено полное повторение экспериментов по определению сходимости методики вторым аналитиком в другой лаборатории. Статистический анализ результатов определения сходимости методики и межлабораторной прецизионности для разных лабораторий приведен в таблицах 6 и 7 соответственно. Межлабораторная прецизионность подтверждена: относительная погрешность среднего результата $\bar{\varepsilon}$ – менее 2,00 %, коэффициент вариации составил менее 1,2 %.

Диапазон концентраций, в котором сохраняется линейная зависимость, а также доказана приемлемая правильность и прецизионность методики, составил от 2 мкг/мл до 25 мкг/мл (10 и 125 % от номинального значения соответственно) и может рассматриваться как **аналитическая область методики**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана методика количественного определения аморфного дарунавир методом УФ-спектрофотометрии, имеющая практическую значимость. При помощи валидационной оценки установлено, что методика является специфичной, линейной в аналитической области, правильной и прецизионной.

Методика может быть использована в качестве альтернативы фармакопейным методам для количественного определения аморфного дарунавир при проведении контроля качества субстанции, что особенно актуально для производственных аптек при проведении входного контроля. Также методика мо-

жет служить основой для разработки методик количественного экспресс-анализа дарунавир в экстенпоральных лекарственных препаратах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- McKeage K., Perry C.M., Keam S.J. Darunavir: a review of its use in the management of HIV infection in adults. *Drugs*. 2009;69:477–503. DOI: 10.2165/00003495-200969040-00007.
- Wang Y., Lv Z., Chu Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS – Research and Palliative Care*. 2015;7:95–104. DOI: 10.2147/hiv.s79956.
- Lascar R., Benn P. Role of darunavir in the management of HIV infection. *HIV/AIDS – Research and Palliative Care*. 2009;1:31–39. DOI: 10.2147/hiv.s5397.
- Saag M.S., Gandhi R.T., Hoy J.F., Landovitz R.J., Thompson M.A., Sax P.E., Smith D.M., Benson C.A., Buchbinder S.P., del Rio C., Eron J.J. Jr., Fätkenheuer G., Günthard H.F., Molina J.-M., Jacobsen D.M., Volberding P.A. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults. 2020 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA*. 2020;324(16):1651–1669. DOI: 10.1001/jama.2020.17025.
- Keating G.M. Darunavir: A Review in Pediatric HIV-1 Infection. *Paediatr Drugs*. 2015;17(5):411–421. DOI: 10.1007/s40272-015-0146-0.
- Pope R. Jr., Kashuba A. Darunavir for use in pregnant women with HIV. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2017; 10(12):1317–1327. DOI: 10.1080/17512433.2017.1390428.
- King N.M., Prabu-Jeyabalan M., Nalivaika E.A., Wigerinck P., de Béthune M.-P., Schiffer C.A. Structural and thermodynamic basis for the binding of TMC114, a next-generation human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Journal of Virology*. 2004;78(21):12012–12021. DOI: 10.1128/jvi.78.21.12012-12021.2004.

8. Tremblay C.L. Combating HIV resistance – focus on darunavir. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2008;4(4):759–765. DOI: 10.2147/tcrm.s1709.
9. Cusato J., Allegra S., de Nicolò A., Calcagno A., D'Avolio A. Precision medicine for HIV: where are we? *Pharmacogenomics*. 2018;19(2):145–165. DOI: 10.2217/pgs-2017-0123.
10. Zolotov S.A., Dain I.A., Demina N.B., Zolotova A.S., Ponomarev E.S. The Effect of Solvents and Drying Temperature on the Physicochemical Properties of Darunavir and Darunavir Ethanolate Substances. *Drug development & registration*. 2021;10(1):67–73. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-67-73.
11. Van Gyseghem E., Stokbroekx S., de Armas H.N., Dickens J., Vanstockem M., Baert L., Rosier J., Schueller L., Van den Mooter G. Solid state characterization of the anti-HIV drug TMC114: interconversion of amorphous TMC114, TMC114 ethanolate and hydrate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;38(5):489–497. DOI: 10.1016/j.ejps.2009.09.013.
12. Kavitha A.N., Raman D., Janaki R.K. A New Validated RP-HPLC Method for the Estimation of Darunavir Ethanolate in Bulk and Tablets. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*. 2020;14(4):652–660.
13. Paul K., Jaswanth Gowda B.H., Shankar, S.J., Reddy D.N. Development and validation of simplified RP-HPLC method for quantification of Darunavir in commercial tablets. *Materials Today: Proceedings*. 2021;47(14):4155–4161. DOI: 10.1016/j.matpr.2021.04.444.
14. Rao K.P., Ramesh B.V., Prasad C.S., Ramana G.V., Rao M.C. Validated isocratic reversed phase liquid chromatographic method for the determination of darunavir in pure and formulations. *Der Pharmacia Lettre*. 2016;8(10):222–228.
15. Reddy B.V.R., Jyothi G., Reddy B.S., Raman N.V.V.S.S., Reddy K.S.C., Rambabu C. Stability-indicating HPLC method for the determination of darunavir ethanolate. *Journal of Chromatographic Science*. 2013;51(5):471–476. DOI: 10.1093/chromsci/bms165.
16. Mantena B.P.V., Rao S.V., Appa Rao K.M.C., Ramakrishna K., Reddy R.S. Method development and validation for the determination of four potential impurities present in darunavir tablets by reverse phase-ultra-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2015;38(12):1236–1246. DOI: 10.1080/10826076.2015.1037449.
17. Timchenko Yu.V. Advantages and disadvantages of high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2021;8(10):335.
18. Kogawa A.C., Salgado H.R.N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tablets. *Physical Chemistry*. 2013;3(1):1–6. DOI: 10.5923/j.pc.20130301.01.
19. Kogawa A.C., Aguiar F.A., Gaitani C.M., Salgado H.R.N. Validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of darunavir in tablets and comparison with the of infrared absorption spectroscopic method. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;3:283–297.
20. Patel B., Suhagia B., Patel C., Panchal H. A simple and sensitive HPTLC method for quantitative analysis of darunavir ethanolate tablets. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*. 2011;24(3):232–235. DOI: 10.1556/jpc.24.2011.3.11.
21. Ghante M., Shelar R.S., Sawant S., Kadam M.M. Development and validation of UV spectrophotometric method for estimation of darunavir ethanolate in bulk and tablet dosage form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;6(7):240–242.
22. Singh V.D., Singh V.K. Chemo-metric assisted UV-spectrophotometric methods for simultaneous estimation of Darunavir ethanolate and Cobicistat in binary mixture and their tablet formulation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021;250:119383. DOI: 10.1016/j.saa.2020.119383.
23. Rao P.K. Validation of Visible Spectrophotometric Methods of Darunavir in Pure and Dosage Forms. *Der Pharma Chemica*. 2016;8(17):54–61.
24. Rajendran V., Ramya Y.N.S., Mani A.D., Dhanaraju M.D. Spectrophotometric determination of darunavir ethanolate by condensation technique. *International Journal of PharmTech Research*. 2016;9(6):301–306.
25. Krishna Kumar Rao K.V.V., Phanindra B., Rajesh K. Spectrophotometric method for estimation of darunavir ethanolate by using MBTH reagent in bulk and pharmaceutical dosage form. *Inventi Rapid*. 2013;4:1–3.
26. Nageswara Rao R., Ramachandra B., Sravan B., Khalid S. LC-MS/MS structural characterization of stress degradation products including the development of a stability indicating assay of Darunavir: An anti-HIV drug. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;89:28–33. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.10.007.
27. Modini A.K., Ranga M., Puppala U., Kaliyapermal M., Geerreddy M.K.R., Samineni R., Grover P., Konidala S.K. Identification, Isolation, and Structural Characterization of Novel Forced Degradation Products of Darunavir Using Advanced Analytical Techniques Like UPLC-MS, Prep-HPLC, HRMS, NMR, and FT-IR Spectroscopy. *Chromatographia*. 2023;86(1):63–78. DOI: 10.1007/s10337-022-04226-z.



Идентификация метаболитов лютеолин-7-гликозида после перорального введения и разработка методики их количественного анализа

Г. В. Адамов¹✉, О. Л. Сайбель¹, А. Н. Бабенко¹, Е. С. Мельников², А. И. Радимич¹,
О. Ю. Куляк^{1,3}, Л. В. Крепкова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР). 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

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

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова». 119192, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, корп. 1

✉ Контактное лицо: Адамов Григорий Васильевич. E-mail: grig.adamov@mail.ru

ORCID: Г. В. Адамов – <https://orcid.org/0000-0001-7347-175X>;
О. Л. Сайбель – <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>;
А. Н. Бабенко – <https://orcid.org/0000-0001-9629-5525>;
Е. С. Мельников – <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>;
А. И. Радимич – <https://orcid.org/0000-0002-1139-8902>;
О. Ю. Куляк – <https://orcid.org/0000-0003-0385-3474>;
Л. В. Крепкова – <https://orcid.org/0000-0002-3580-336X>.

Статья поступила: 07.05.2024

Статья принята в печать: 09.08.2024

Статья опубликована: 09.08.2024

Резюме

Введение. Разработка и регистрация противовирусных препаратов является актуальной задачей. Флавоноиды, в частности лютеолин-7-гликозид (цинарозид, лютеолин-7-О-гликозид), демонстрируют высокую противовирусную активность широкого спектра *in vitro*, а промышленный регламент получения лютеолин-7-гликозида из листьев ивы остролистной уже разработан в ФГБНУ ВИЛАР. Одной из проблем при внедрении флавоноидов в медицинскую практику является их низкая биодоступность и интенсивная биотрансформация. Существующие публикации приводят противоречивые данные по фармакокинетике лютеолин-7-гликозида, в связи с чем было проведено собственное исследование.

Цель. Разработать методику количественного анализа лютеолин-7-гликозида и его метаболитов в плазме крови и апробировать ее на лабораторных животных.

Материалы и методы. Эксперименты на животных проводили согласно требованиям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Для разработки методики анализа и дальнейшего уточнения временных интервалов отбора проб крови анализировали временные точки: через 30, 60 минут, 2, 4, 8, 24 часа после введения исследуемого вещества. Пробирки с цитратной кровью лабораторных животных центрифугировали при 2000 оборотов в минуту в течение 10 минут. Плазму помещали в пробирку типа «эппендорф», замораживали и хранили при температуре –20 °С до проведения хроматографического анализа. Пробоподготовку плазмы крови проводили методом осаждения метиловым спиртом, супернатант хроматографически разделяли на колонке Luna® C18 100 Å, 250 × 4,6 мм, 5 мкм, в градиентном режиме в системе «вода – ацетонитрил» и модификатором – 0,2%-й муравьиной кислотой. Метаболиты идентифицировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Для этого интерпретировали спектральные характеристики пиков, которые появились на хроматограммах образцов плазмы крови после перорального введения лютеолин-7-гликозида. Концентрацию анализируемых веществ оценивали методом внутреннего стандарта, в качестве которого выступал рутин. Для определения концентрации лютеолина в качестве стандартного образца использовали стандартизованную субстанцию лютеолина, концентрацию остальных метаболитов оценивали в пересчете на лютеолин.

Результаты и обсуждение. Удалось установить, что после перорального введения лабораторным животным лютеолин-7-гликозида в крахмальном клейстере нативный лютеолин-7-гликозид в плазме крови не обнаруживается. Основными метаболитами являлись лютеолин-диглюкуронид и лютеолин-глиукуронид, их максимальные концентрации в плазме почти в три раза выше, чем концентрации лютеолина и метиллютеолина-диглюкуронида. Результаты сопоставлены с данными других исследований.

© Адамов Г. В., Сайбель О. Л., Бабенко А. Н., Мельников Е. С., Радимич А. И., Куляк О. Ю., Крепкова Л. В., 2024

© Adamov G. V., Saybel O. L., Babenko A. N., Melnikov E. S., Radimich A. I., Kulyak O. Yu., Krepkova L. V., 2024

Заключение. Отсутствие в плазме крови нативного лютеолин-7-гликозида после перорального введения требует пересмотра адекватности выводов, полученных при исследованиях его активности в опытах *in vitro*. Вместе с тем наличие противовирусной активности *in vivo* обуславливает необходимость проведения дальнейших исследований для установления реальных механизмов действия данной лекарственной субстанции.

Ключевые слова: лютеолин-7-гликозид, метаболизм, флавоноиды, биодоступность

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

Вклад авторов. Г. В. Адамов – ВЭЖХ-анализ, валидация методики количественного анализа, составление дизайна исследования, интерпретация результатов. О. Л. Сайбель – руководитель проекта. А. Н. Бабенко – работа с лабораторными животными, и биологическими жидкостями. Е. С. Мельников – ВЭЖХ-МС анализ, валидация методики количественного анализа. А. И. Радимич – получение субстанции лютеолин-7-гликозида. О. Ю. Куляк – интерпретация результатов исследования. Л. В. Крепкова – организация работы с лабораторными животными.

Финансирование. Данная работа проведена согласно плану научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме: «Фитохимическое обоснование ресурсосберегающих технологий переработки лекарственного растительного сырья и рационального использования биологически активных веществ растительного происхождения» (FGUU-2022-0011).

Для цитирования: Адамов Г. В., Сайбель О. Л., Бабенко А. Н., Мельников Е. С., Радимич А. И., Куляк О. Ю., Крепкова Л. В. Идентификация метаболитов лютеолин-7-гликозида после перорального введения и разработка методики их количественного анализа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):126–137. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1767>

Identification of luteolin-7-glucoside metabolites after oral administration and development of a method for their quantitative analysis

Grigorii V. Adamov¹✉, Olga L. Saybel¹, Alexandra N. Babenko¹, Evgeniy S. Melnikov²,
Andrey I. Radimich¹, Olesya Yu. Kulyak^{1, 3}, Lyubov V. Krepkova¹

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants. 7/1, Grina str., Moscow, 117216, 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 Lomonosov Moscow State University. 27/1, Lomonosovsky prospect, Moscow, 119192, Russia

✉ **Corresponding author:** Grigoriy V. Adamov. **E-mail:** grig.adamov@mail.ru

ORCID: Grigorii V. Adamov – <https://orcid.org/0000-0001-7347-175X>;

Olga L. Saybel – <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>;

Alexandra N. Babenko – <https://orcid.org/0000-0001-9629-5525>;

Evgeniy S. Melnikov – <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>;

Andrey I. Radimich – <https://orcid.org/0000-0002-1139-8902>;

Olesya Yu. Kulyak – <https://orcid.org/0000-0003-0385-3474>;

Lyubov V. Krepkova – <https://orcid.org/0000-0002-3580-336X>.

Received: 07.05.2024

Accepted: 09.08.2024

Published: 09.08.2024

Abstract

Introduction. The development and registration of antiviral drugs is an urgent task. Flavonoids, in particular, luteolin-7-glycoside (cinaroside, luteolin-7-O-glycoside) demonstrate high broad-spectrum antiviral activity *in vitro*, and the industrial regulations for the production of luteolin-7-glycoside from the leaves of holly willow have already been developed at the VILAR. One of the problems with the introduction of flavonoids into medical practice is their low bioavailability and intensive biotransformation. Existing publications provide contradictory data on the pharmacokinetics of luteolin-7-glycoside, and therefore our own research was conducted.

Aim. To develop a methodology for the quantitative analysis of luteolin-7-glycoside and its metabolites in blood plasma and to test it on laboratory animals.

Materials and methods. Animal experiments were carried out in accordance with the requirements of the "Guidelines for conducting preclinical studies of medicines". To develop a method of analysis and further clarify the time intervals of blood sampling, time points were analyzed: 30, 60 minutes, 2, 4, 8, 24 hours after administration of the test substance. Tubes with citrate blood of laboratory animals were centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes. The plasma was placed in an Eppendorf-type test tube, frozen and stored at –20 °C until chromatographic analysis was performed. Blood plasma sample preparation was carried out by precipitation with methyl alcohol, the supernatant was chromatographically separated on a column Luna® 5 µm C18 column 100 Å 250 × 4.6 mm in a gradient mode in a water-acetonitrile system and a modifier – 0.2 % formic acid. The metabolites were identified by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. To do this, the spectral characteristics of the peaks that appeared on the chromatograms of blood plasma samples after oral administration of luteolin-7-glycoside were interpreted. The concentration of the analyzed substances was assessed by the

internal standard method, which was rutin. To determine the concentration of luteolin, a standardized luteolin substance was used as a standard sample, the concentration of the remaining metabolites was estimated in terms of luteolin.

Results and discussion. It was found that after oral administration of luteolin-7-glycoside in starch paste to laboratory animals, native luteolin-7-glycoside was not detected in blood plasma. The main metabolites were luteolin-diglucuronide and luteolin-glucuronide, their maximum plasma concentrations are about three times higher than luteolin and methyllyuteolin-diglucuronide. The results are compared with data from other studies.

Conclusion. The absence of native luteolin-7-glycoside in blood plasma after oral administration makes it necessary to seriously reconsider the relevance of the conclusions obtained during studies of its activity *in vitro*. However, in the presence of antiviral activity *in vivo*, there is an urgent need for further research to establish the real mechanisms of action of this medicinal substance.

Keywords: luteolin-7-glucoside, metabolism, flavonoids, bioavailability

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. Grigori V. Adamov – HPLC analysis, validation of the quantitative analysis method, development of the study design, interpretation of the results. Olga L. Saibel – project manager. Alexandra N. Babenko – work with laboratory animals and biological fluids. Evgeniy S. Melnikov – HPLC-MS analysis, validation of the quantitative analysis method. Andrey I. Radimich – obtaining the luteolin-7-glycoside substance. Olesya Yu. Kulyak – interpretation of the study results. Lyubov V. Krepkova – organization of work with laboratory animals.

Acknowledgment. This work was carried out in accordance with the research plan of the Federal State Budgetary Scientific Institution VILAR on the topic: "Phytochemical substantiation of resource-saving technologies for the processing of medicinal plant raw materials and the rational use of biologically active substances of plant origin" (FGUU-2022-0011).

For citation: Adamov G. V., Saybel O. L., Babenko A. N., Melnikov E. S., Radimich A. I., Kulyak O. Yu., Krepkova L. V. Identification of luteolin-7-glucoside metabolites after oral administration and development of a method for their quantitative analysis. *Drug development & registration*. 2024;13(3):126–137. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1767>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время имеется запрос на эффективные, доступные и нетоксичные противовирусные препараты. Этим критериям отвечают некоторые растительные препараты на основе флавоноидов. Для внедрения во врачебную практику данных препаратов необходимо строгое соблюдение принципов доказательной медицины, понимание механизмов действия, фармакокинетики, лекарственных взаимодействий, проведение доклинических и клинических исследований. Флавоноиды как лекарства отличаются безопасностью, поскольку регулярно поступают в организм с растительной пищей и пищеварительная система приспособлена к расщеплению данных ксенобиотиков. Большое количество успешных экспериментов *in vitro* и *in vivo* касательно противовирусной активности флавоноидов, и в частности лутеолина и его производных, подчеркивает целесообразность дальнейших исследований [1-21, 5, 7, 9–14].

Перспективным в этом отношении флавоноидом является лутеолин и его производное – лутеолин-7-глюкозид (ЛГ). Опубликованные данные указывают

на высокую противовирусную активность лутеолина *in vivo* [15] и *in vitro* в клетках человека [4].

В ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» разработана технология получения субстанции ЛГ из доступного растительного сырья.

В соответствии с требованиями Евразийского экономического союза в качестве одного из этапов разработки нового лекарственного средства обозначена необходимость приведения фармакокинетических и фармакодинамических свойств препарата.

Фармакокинетика флавоноидов представлена в систематических обзорах по этой теме [2]. Однако ввиду влияния микрофлоры кишечника некоторые ключевые положения остаются неясными, а данные характеризуются противоречивостью.

Ряд работ исследователей разных стран указывают на то, что ЛГ и лутеолин обнаруживаются в крови после перорального применения, иные, напротив, указывают, что в крови присутствуют только агликон лутеолин и его конъюгаты [1, 3, 16, 17]. В связи с этим открытым остается вопрос о том, можно ли рассматривать ЛГ как пролекарство и его фармако-

логический эффект в организме человека связывать с активностью его метаболитов? Также встает вопрос о целесообразности применения ЛГ в виде гликозида, или все же эффективнее использовать агликон после предварительного гидролиза для достижения наибольшей эффективности?

Таким образом, целью проведенной работы является изучение биодоступности лютеолин-7-гликозида и идентификация его метаболитов в плазме крови крыс после перорального применения. Для достижения поставленной цели определены следующие задачи: разработать методику количественного определения ЛГ и лютеолина в плазме крови, идентифицировать метаболиты и оценить уровни их концентраций, провести пилотное фармакокинетическое исследование ЛГ на лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах *Wistar* с массой тела 250–270 г, полученных из питомника ФГБНУ ВИЛАР. Животных содержали по 6 особей в клетке в стандартных условиях вивария при естественном освещении и постоянной температуре (21–23 °C), свободном доступе к воде и гранулированному корму. Эксперимент проводили в осенний период. Лабораторные животные прошли трехнедельный карантин в условиях вивария и клинически были здоровы. Эксперименты на животных проводили согласно требованиям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [8] и с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей¹, также они получили одобрение биоэтической комиссии ФГБНУ ВИЛАР.

Реактивы. Ацетонитрил (марка «HPLC Super Gradient», Macron Fine Chemicals™), метанол (марка «ОСЧ», для градиентной ВЭЖХ, ООО ТД «ХИММЕД», Россия), кислота муравьиная (98,0–100,0 %, Sigma-Aldrich, США). Объект исследования – экспериментальная партия субстанции лютеолин-7-глюкозида, полученная в ФГБНУ ВИЛАР, с содержанием основного вещества по ВЭЖХ 97,4 %. Стандартные образцы рутина (содержание основного вещества по ВЭЖХ 99,1 %) и лютеолина (содержание основного вещества по ВЭЖХ 99,5 %) были получены в ФГБНУ ВИЛАР, перед использованием были высушены до постоянной массы.

¹ Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Страсбург; 18 марта 1986 г. Доступно по: <https://rm.coe.int/168007a6a8>. Ссылка активна на 07.05.2024.

МЕТОДЫ

Подготовка ЛГ и пероральное введение

Лютеолин-7-гликозид вводили крысам внутрижелудочно с помощью металлического зонда натошак (животные не получали корм в течение 8 часов до его введения) в дозе 100 мг/кг в виде суспензии, приготовленной на 1%-м крахмальном геле. Объем вводимой суспензии рассчитывали с учетом массы тела животного. Ввиду большой разницы применяемых доз, указанных в исследованиях других авторов (22,4 мг/кг массы [3], 1000 мг/кг массы [1], 170 мг/кг массы [16], 0,48 мг/кг массы [17]), в настоящем исследовании использовали усредненную дозировку, которая позволит сравнить полученные результаты с литературными данными.

Отбор цельной крови, получение плазмы и консервация

До введения, через 30, 60 мин, 2, 4, 8 и 24 ч после введения исследуемого вещества проводили забор крови из хвостовой вены (для отбора проб в каждой временной точке использовали 1 животное, таким образом в данном пилотном исследовании использовано 7 животных). Отбор крови проводили в стерильные пластиковые пробирки, в которые предварительно добавили 3,2%-й раствор цитрата натрия. Соотношение антикоагулянта и крови в этих пробирках составляло 1 : 9 соответственно. Пробирки с кровью центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Плазму помещали в пробирку типа «эппендорф», замораживали и хранили при температуре –20 °C до проведения хроматографического анализа.

Калибровочные образцы и образцы контроля качества

Стандартные растворы лютеолина в метаноле готовили путем разведения исходного стандартного раствора до концентраций 100, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 20000 нг/мл. Растворы для приготовления образцов контроля качества готовили в концентрациях 100, 300, 6000 и 15000 нг/мл

Для приготовления калибровочных образцов и образцов контроля качества в пластиковую пробирку типа «эппендорф» помещали 80 мкл интактной плазмы крови и 20 мкл стандартного раствора. Концентрация лютеолина в плазме крови для калибровочных образцов составила 20, 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000 нг/мл, для образцов контроля качества – 20, 60, 1200 и 3000 нг/мл.

Пробоподготовка плазмы крови

Плазму крови размораживали при комнатной температуре и перемешивали. Пробоподготовку проводили методом осаждения белков плазмы крови метанолом. В исследовании по идентификации метаболитов ЛГ к 100 мкл плазмы крови прибавляли

200 мкл метанола, в исследовании с целью количественного определения ЛГ и его метаболитов к 100 мкл испытуемой плазмы крови, калибровочного образца или образца контроля качества прибавляли 200 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор рутина в метаноле 3000 нг/мл). Суспензию перемешивали в течение 30 с и центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин, супернатант переносили в вials и хроматографировали.

Проведение анализа

Определение концентрации лутеолина в плазме крови крыс проводили на жидкостном хроматографе Prominence-i LC-2030C 3D с УФ-детектором (Shimadzu Corporation Япония), колонке Luna® C18 100 Å, 250 × 4,6 мм, 5 мкм. Элюирование в градиентном режиме, подвижная фаза А – 0,2%-й раствор муравьиной кислоты в воде, В – 0,2%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Объемная доля компонента В изменялась согласно программе: 0 мин – 16 %, 14 мин – 18 %, 40 мин – 50 %, 41 мин – 98 %, 45 мин – 98 %, 46 мин – 16 %, 50 мин – остановка программы. Колонку термостатировали при температуре 26 °С, объем вводимой пробы – 80 мкл. Хроматограмма регистрировалась при длине волны 350 нм. Расчет концентрации проводили методом внутреннего стандарта.

Идентификацию метаболитов лутеолин-7-гликозида проводили на хроматографе LC-30 Nexera с МС/МС-детектором LCMS-8040 (Shimadzu Corporation Япония) при тех же хроматографических условиях. Масс-спектры регистрировали в режиме сканирования полного ионного тока при положительной и отрицательной ионизации методом электрораспыления.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация метаболитов ЛГ

Для идентификации метаболитов ЛГ, циркулирующих в крови крыс, образцы плазмы после осаждения метанолом анализировали с использованием ВЭЖХ-УФ-МС. В результате чего получены хроматограммы при длине волны 350 нм и зарегистрированы масс-спектры.

В ходе исследования путем сравнения хроматограмм при длине волны 350 нм для образцов до и после введения ЛГ крысам определены пики, соответствующие метаболитам ЛГ. Затем проводили интерпретацию масс-спектров, зарегистрированных при временах удерживания, соответствующих пикам на УФ-хроматограммах при длине волны 350 нм, которые отсутствовали на хроматограмме холостого образца и появились после введения ЛГ. Типичная хроматограмма плазмы крови при определении концентрации ЛГ и его метаболитов приведена на рисунке 1, масс-спектры метаболитов на соответствующих временах удерживания на хроматограмме при идентификации метаболитов представлены на рисунке 2.

В условиях мягкой ионизации электроспрея масс-анализатора Shimadzu LCMS-8040 при положительной ионизации в основном характерно протонирование, а при отрицательной – депротонирование. Исходя из полученных результатов, можно сделать выводы, что молекулярные массы соединений составляют 638 (Rt – 22,3 мин), 652 (Rt – 23,6 мин) и 462 (Rt – 28,0 мин), что соответствует лутеолин-диглюкурониду, метил-лутеолин-диглюкурониду и

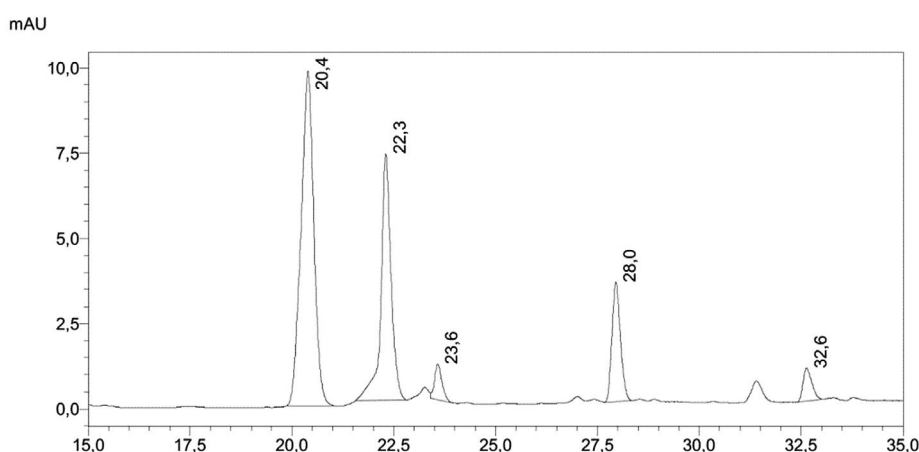


Рисунок 1. Хроматограмма плазмы крови крысы во временной точке 1 ч:

Rt = 20,4 мин – внутренний стандарт рутин; Rt = 22,3 мин – лутеолин-диглюкуронид; Rt = 23,6 мин – метиллутеолин-диглюкуронид; Rt = 28,0 мин – лутеолин-глюкуронид; Rt = 32,6 мин – лутеолин

Figure 1. Chromatogram of rat blood plasma at a time point of 1 hour:

Rt = 20.4 min – internal standard rutin; Rt = 22.3 min – luteolin-diglucuronide; Rt = 23.6 min – methyl luteolin-diglucuronide; Rt = 28.0 min – luteolin-glucuronide; Rt = 32.6 min – luteolin

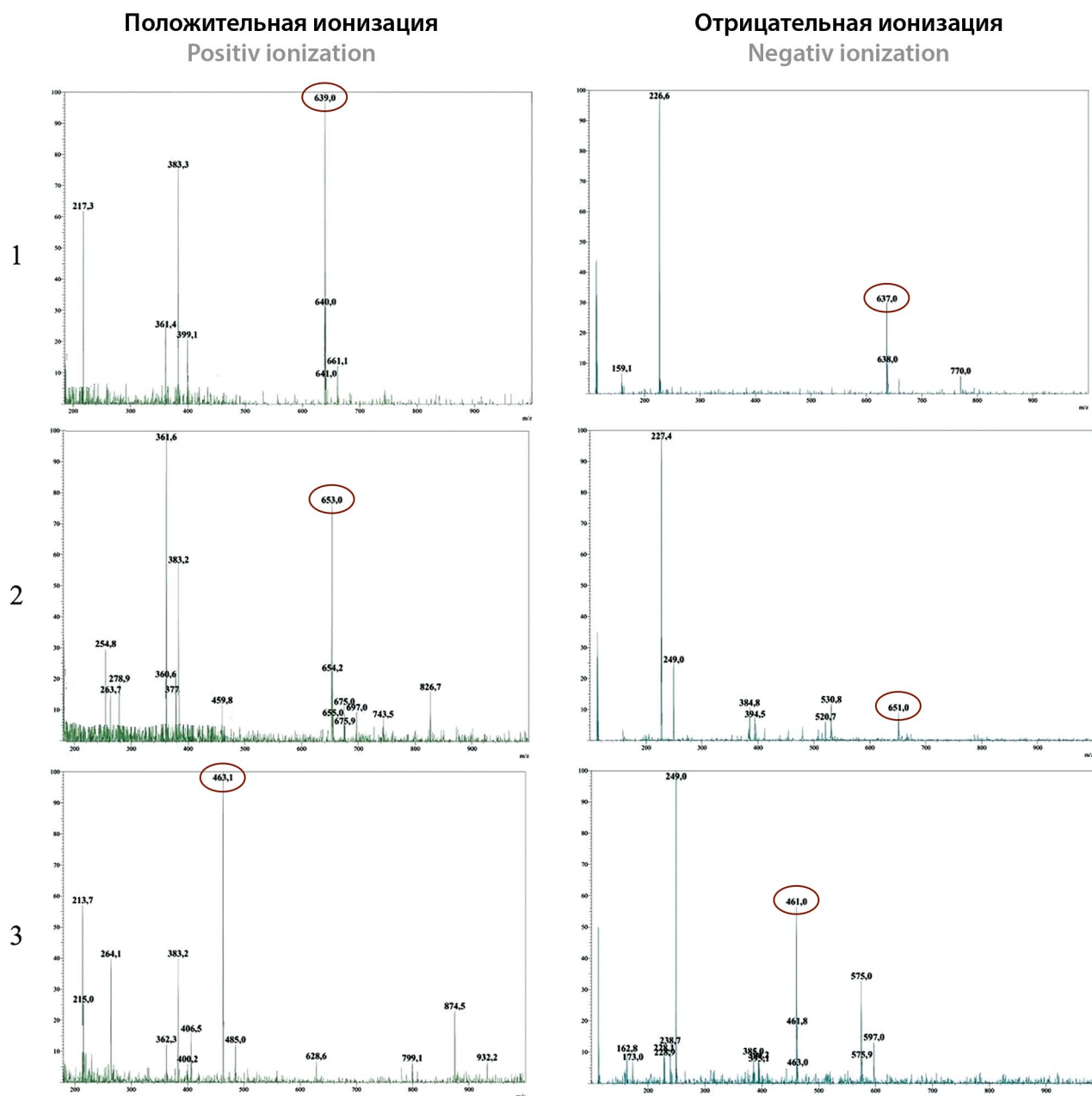


Рисунок 2. МС-спектры соединений:

1 – $R_t = 22,3$ мин – лютеолин-диглюкуронид; **2** – $R_t = 23,6$ мин – метиллютеолин-диглюкуронид; **3** – $R_t = 28,0$ мин – лютеолин-глюкуронид

Figure 2. MS spectra of compounds:

1 – $R_t = 22.3$ min – luteolin-digluronide; **2** – $R_t = 23.6$ min – methyluteolin-diglucuronide; **3** – $R_t = 28.0$ min – luteolin-glucuronide

лютеолин-глюкурониду соответственно. Лютеолин был идентифицирован по времени удерживания ($R_t = 32,6$ мин).

В рамках данного исследования ни с использованием ВЭЖХ-УФ, ни с помощью ВЭЖХ-МС не удалось подтвердить присутствие ЛГ в плазме крови в нативном состоянии, несмотря на то, что некото-

рые существующие исследования [1] описывают динамику изменения концентрации ЛГ в плазме крови крыс после перорального приема. Вероятнее всего, лютеолин-диглюкуронид был ошибочно интерпретирован как ЛГ, так как оба эти соединения имеют схожее хроматографическое поведение и УФ-спектр.

Количественный анализ

Для обоснования возможности применения методики определения лутеолина в плазме крови крыс была проведена ее валидация по параметрам «селективность и специфичность», «нижний предел количественного определения» (НПКО), «аналитический диапазон», «линейность», «правильность и прецизионность», «перенос пробы», «стабильность». Ввиду того, что в испытуемых образцах содержание ЛГ находится ниже предела детектирования, валидация методики проводилась только для лутеолина.

Селективность и специфичность методики доказана отсутствием на хроматограммах образцов интактной плазмы крови пиков с временами удерживания лутеолина, ЛГ и рутина. На хроматограмме образцов контроля качества разрешение между пиками аналитов и ближайших эндогенных веществ составляло более 3,1. При анализе образцов плазмы крови после введения ЛГ было выявлено, что метаболит лутеолин-диглюкуронид имеет время удерживания около 22,3 мин, а исходный ЛГ – 22,0 мин и полного разделения данных веществ не наблюдается. Однако с помощью ВЭЖХ-МС установлено, что в образцах плазмы крови после введения ЛГ при времени удерживания ЛГ не регистрируются масс-спектры, характерные для данного вещества. Таким образом, нативный ЛГ не обнаруживается в плазме крови после перорального приема и не затрудняет определение лутеолин-диглюкуронида.

Аналитический диапазон и линейность методики подтверждены в области концентраций лутеолина в плазме крови 20–4000 нг/мл. Коэффициент корреляции был не менее 0,99, пример калибровочного графика представлен на рисунке 3. Соотношение

«введено/найдено» для калибровочных образцов находили в диапазоне 91–103 %, среднее значение составляло 95,6 %.

Правильность и прецизионность оценивали при анализе образцов контроля качества (по пять образцов для каждого из четырех уровней концентрации) в рамках одного цикла и трех циклов, проанализированных в разные дни. Максимальное отклонение измеренной концентрации от номинальной составило 9,7 %, относительное стандартное отклонение среднего результата не превышало 7,2 %.

НПКО оценивали по соотношению «сигнал/шум». Уровень шума составлял для образцов интактной плазмы крови $2 \cdot 10^{-5}$ В. В точке НПКО, которая составляла 20 нг/мл, высота пика лутеолина – $6 \cdot 10^{-4}$ В. Таким образом, в точке НПКО соотношение «сигнал/шум» превышало 20/1.

При введении образца интактной плазмы после анализа калибровочного образца с концентрацией 4000 нг/мл пик лутеолина на хроматограмме не обнаруживали, что доказывает отсутствие переноса пробы.

Стабильность образцов после пробоподготовки оценивали путем анализа одной и той же пробы после 8 часов хранения в автоматическом пробоотборнике прибора относительно свежеприготовленных калибровочных образцов, разница не превышала 7,5 %. Стабильность лутеолина в плазме крови в условиях заморозки при -20°C подтверждена в течение 60 дней. Различия измеренной концентрации в начале и в конце периода хранения составило не более 5,3 %.

Разработанную и валидированную методику применяли для определения концентрации лутеолина в плазме крови крыс после перорального введе-

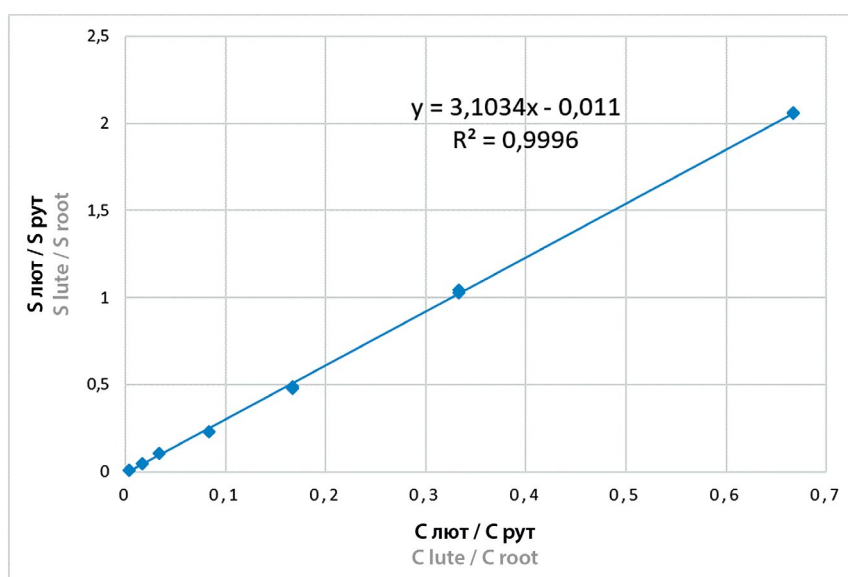


Рисунок 3. Калибровочная кривая для расчета концентрации лутеолина в плазме крови лабораторных животных

Figure 3. Calibration curve for calculating the concentration of luteolin in the blood plasma of laboratory animals

ния ЛГ. Результаты представлены графически на рисунке 4. В точке 0,5 ч концентрация лутеолина все еще находилась на уровне ниже НПКО. Максимальная концентрация зафиксирована в точке 1 ч, второй максимум – в точке 8 ч после введения, за 24 ч лутеолин полностью выводился из организма. Наличие второго максимума концентрации лутеолина требует подтверждения с использованием большего числа лабораторных животных, результаты могут быть ошибочно интерпретированы из-за вариативности между животными. Так, исследование [1] демонстрирует, что в интервале 2–8 ч после внутрижелудочного введения для лутеолина наблюдается плато фармакокинетической кривой.

Одновременно с изучением фармакокинетики лутеолина были получены площади пиков идентифицированных метаболитов. Без стандартных образцов метаболитов не представляется возможным валидировать методику количественного определения и оценить концентрации метаболитов в плазме крови крыс. Однако, учитывая, что углеводная часть гликозидов и глюкуронидов не имеет хромофорных групп, молярные экстинкции этих соединений будут близки с агликонами, соответственно, зависимости отклика УФ-детектора от молярной концентрации флавоноидов и их метаболитов будут тоже близки. Так, согласно Т. Mabry с соавт. [6] молярная экстинкция в максимуме поглощения 22 исследованных флавонов различной структуры варьирует не более чем на 15,3 %.

С данным допущением мы построили фармакокинетические кривые для метаболитов ЛГ (рисунок 5). Полученные результаты доказывают, что основными метаболитами ЛГ после перорального приема у крыс являются диглюкуронид и моноглюкуронид лутеолина. Их максимальные концентрации выше, чем концентрации лутеолина, в 3,6 и 2,7 раза соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, впервые в рамках пилотного исследования на 7 лабораторных животных оценены уровни концентраций четырех метаболитов ЛГ. Максимальная концентрация в плазме крови для лутеолина достигалась к 1 часу, для остальных метаболитов – к 2 часам. К 8 часам концентрации метаболитов в плазме крови крыс находились все еще на высоком уровне. В связи с этим в рамках дальнейшего исследования будет увеличена частота отбора в районе максимальной концентрации и добавлены точки отбора после 8 часов.

Опубликованные ранее исследования сосредоточены на измерении концентрации ЛГ и лутеолина (таблица 1). Однако описаны и другие исследования, приводящие фармакокинетические кривые нативного ЛГ [1, 16, 17], а также работы, доказывающие невозможность его всасывания в виде гликозида [3]. Так, описано исследование, в котором лутеолин-7-гликозид (ЛГ) растворяли в диметилсульфоксиде и

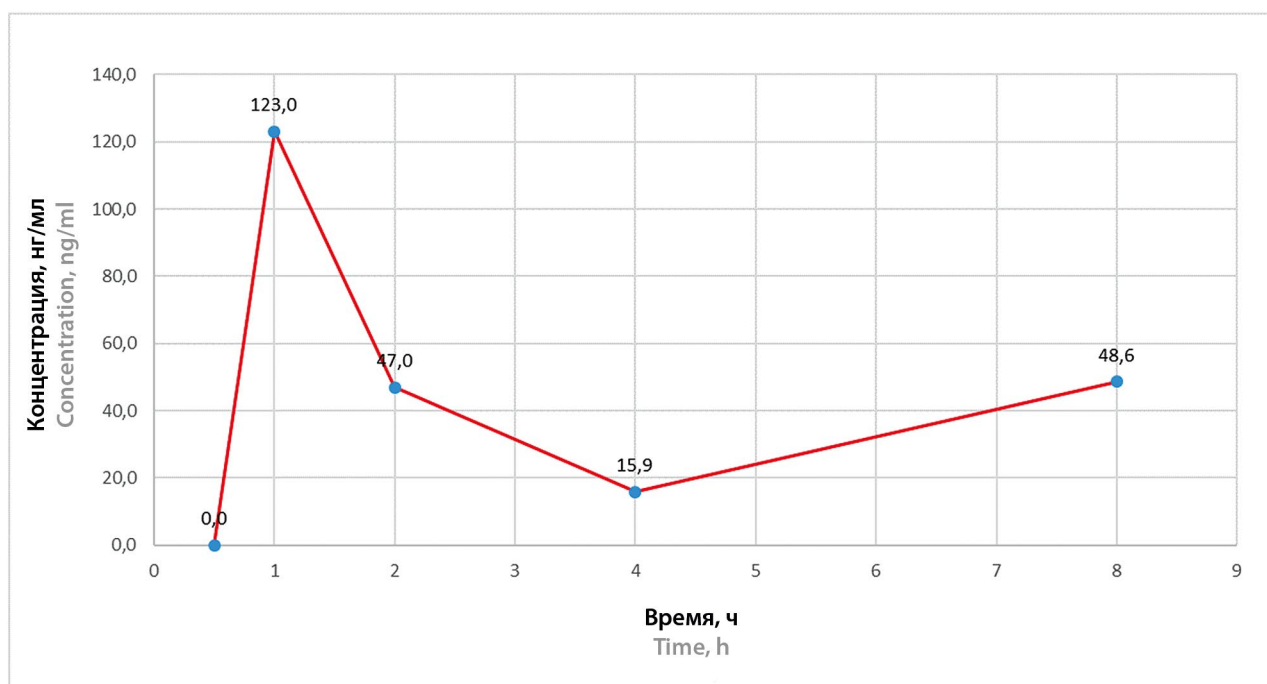


Рисунок 4. Кривая зависимости массовой концентрации лутеолина в плазме крови от времени после однократного введения 100 мг/кг лутеолин-7-гликозида на 1 кг массы лабораторных животных

Figure 4. Curve of the dependence of the mass concentration of luteolin in blood plasma on time after a single administration of 100 mg/kg luteolin-7-glucoside per kg body weight of laboratory animals

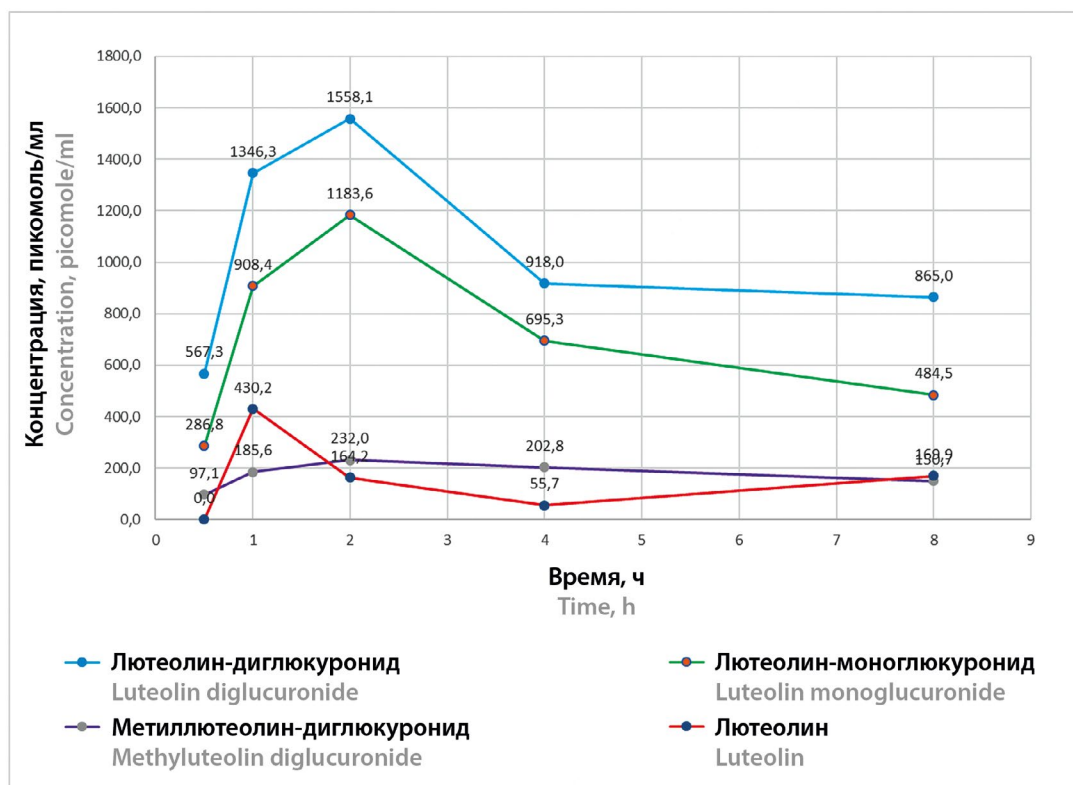


Рисунок 5. Кривая зависимости молярной концентрации от времени лутеолин-диглюкуронида, метиллутеолин-диглюкуронида, лутеолин-глюкуронида и лутеолина в плазме крови после однократного введения 100 мг лутеолин-7-глюкозида на 1 кг массы лабораторных животных

Figure 5. Molar concentration versus time curve of luteolin-diglucuronide, methyluteolin-diglucuronide, luteolin-glucuronide and luteolin in blood plasma after a single administration of 100 mg of luteolin-7-glucoside per kg of laboratory animals

изучали фармакокинетические кривые нативного ЛГ и его агликаона – лутеолина. [1]. В другом показано, что основным метаболитом является моноглюкуронид лутеолина, образующийся в энтероцитах кишечника, в крови также идентифицированы глюкурониды диосметина и нативный лутеолин. В работе [3] и настоящем исследовании животным вводили суспензию ЛГ, после чего ЛГ не обнаруживался в крови в нативной форме. Выводятся флавоны преимущественно с мочой, в обзоре [2] проводится эксперимент с меченым апигенином, структурно близким к лутеолину, показано, что 51 % его выводится с мочой, 12 % – с фекалиями. Конъюгаты флавоноидов, выделяемые в желчь, могут гидролизироваться кишечными бактериями до агликонов, которые содержат β -глюкуронидазу и арилсульфатазу, чем может быть обусловлено наличие второго максимума концентрации агликаона [1]. В эксперименте [21] по изучению метаболизма лутеолина метаболиты лутеолина обнаружены в желчи и предположена энтерогепатическая циркуляция.

Отдельно стоит рассмотреть исследования, в которых изучена биодоступность ЛГ в составе растительных экстрактов [16, 17]. В данных исследованиях

указано, что ЛГ может достигать кровотока. Если данные верны, вероятнее всего, биодоступность ЛГ тесным образом связана с сопутствующими компонентами при р.о. введении. ЛГ практически нерастворим в воде, растворим в диметилсульфоксиде [1], в составе суммарного экстракта ЛГ и другие флавоноиды переходят в раствор из-за взаимного увеличения растворимости родственных веществ и оказывают фармацевтический эффект [18, 19, 20]. В исследовании [3] и настоящем исследовании животным вводили суспензию ЛГ, после чего ЛГ не обнаруживался в крови в нативной форме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенного исследования установлен состав метаболитов после введения крысам суспензии ЛГ в крахмальном клейстере, разработана и валидирована методика количественного определения лутеолина в плазме крови крыс, проведена предварительная оценка концентраций метаболитов

Таблица 1. Результаты изучения фармакокинетики ЛГ по данным литературы
Table 1. Results of studying the pharmacokinetics of luteolin-7-glucoside according to literature

Способ введения Method of administration	Результаты Results	Источник References
Р.о. 1 г ЛГ на 1 кг массы животного (растворитель: вода – диметилсульфоксид) R.o. 1 g luteolin-7-glycoside per 1 kg of animal weight (solvent: water – dimethyl sulfoxide)	ЛГ: $C_{\max} = 3,04 \pm 0,76$ мкг/мл $t_{\max} = 290 \pm 94$ мин биодоступность = 10 ± 2 % AUC (Area Under Curve) = 2109 ± 350 мкг · мин/мл Лютеолин: $C_{\max} = 2,45 \pm 0,5$ мкг/мл $t_{\max} = 280 \pm 57$ мин AUC = 1028 ± 253 мкг · мин/мл Luteolin-7-glycoside: $C_{\max} = 3.04 \pm 0.76$ µg/ml $t_{\max} = 290 \pm 94$ min bioavailability = 10 ± 2 % AUC (Area Under Curve) = 2109 ± 350 µg · min/ml Luteolin: $C_{\max} = 2.45 \pm 0.5$ µg/ml $t_{\max} = 280 \pm 57$ min AUC = 1028 ± 253 µg · min/ml	[1]
Анализ абсорбции ЛГ с использованием вывернутого тонкого кишечника крысы Luteolin-7-glycoside absorption assay using inverted rat small intestine	ЛГ: не обнаружено Luteolin-7-glycoside: not detected	[3]
50 мкмоль/кг массы животного (в 0,5%-м растворе натрия карбоксиметилцеллюлозы) 50 µmol/kg animal weight (in 0.5 % sodium carboxymethylcellulose solution)	ЛГ: не обнаружено Luteolin-7-glycoside: not detected	[3]
Р.о. 10 г экстракта цветков хризантемы (ЛГ 1,71 %) на 1 кг массы животного R.o. 10 g of chrysanthemum flower extract (luteolin-7-glycoside 1.71 %) per 1 kg of animal weight	ЛГ: $C_{\max} = 2,55 \pm 1,12$ мкг/мл $t_{\max} = 6,38 \pm 3,80$ ч Luteolin-7-glycoside: $C_{\max} = 2.55 \pm 1.12$ µg/ml $t_{\max} = 6.38 \pm 3.80$ h	[16]
Р.о. 4 г экстракта корневищ <i>Aglaomorpha fortunei</i> (ЛГ 0,012 %) на 1 кг массы животного R.o. 4 g of <i>Aglaomorpha fortunei</i> rhizome extract (luteolin-7-glycoside 0.012 %) per 1 kg of animal weight	ЛГ: AUC (0–∞) = $565,98 \pm 56,06$ нг · ч/мл $T_{\max} = 1$ ч $C_{\max} = 440,37 \pm 52,16$ мкг/мл Luteolin-7-glycoside: AUC (0–∞) = 565.98 ± 56.06 ng · h/ml $T_{\max} = 1$ h $C_{\max} = 440.37 \pm 52.16$ µg/ml	[17]

литов. В рамках пилотного исследования определены некоторые фармакокинетические параметры, что позволит минимизировать количество лабораторных животных при последующих экспериментах. Удалось установить, что после перорального введения ЛГ лабораторным животным нативный ЛГ в плазме крови не обнаруживается, а метаболитами являются лютеолин-диглюкуронид и лютеолин-глю-

куронид, их максимальные концентрации в плазме почти в три раза выше, чем концентрации лютеолина и метиллютеолина-диглюкуронида. Разработанные методики и полученные предварительные фармакокинетические кривые будут использованы для разработки дизайна дальнейших фармакокинетических исследований с необходимым количеством повторности и временных точек отбора крови.

В дальнейших фармакодинамических исследованиях субстанции ЛГ целесообразно изучение метаболитов: лутеолина агликона, лутеолин-диглюкуро-нида, лутеолин-глюкуроида и метиллутеолина-ди-глюкуроида.

ЛИТЕРАТУРА

- Lin L.-C., Pai Y.-F., Tsai T.-H. Isolation of luteolin and luteo-
lin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat
Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *Journal of agri-
cultural and food chemistry*. 2015;63(35):7700–7706. DOI:
10.1021/jf505848z.
- Макарова М. Н. Биодоступность и метаболизм флавоноидов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2011;74(6):33–40. DOI: 10.30906/0869-2092-2011-74-6-33-40.
- Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Yu., Yamamoto H., Kinase N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. *FEBS letters*. 1998;438(3):220–224. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01304-0.
- Cui X. X., Yang X., Wang H.-J., Rong X.-Y., Jing S., Xie Y.-H., Huang D.-F., Zhao C. Luteolin-7-O-glucoside present in lettuce extracts inhibits hepatitis B surface antigen production and viral replication by human hepatoma cells in vitro. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2425. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02425.
- Caporali S., De Stefano A., Calabrese C., Giovannelli A., Pieri M., Savini I., Tesaro M., Bernardini S., Minieri M., Terri-
noni A. Anti-inflammatory and active biological proper-
ties of the plant-derived bioactive compounds luteolin
and luteolin 7-glucoside. *Nutrients*. 2022;14(6):1155. DOI:
10.3390/nu14061155.
- Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. The systematic
identification of flavonoids. New York: Springer Science &
Business Media; 2012. P. 40.
- Быков В. А., Дубинская В. А., Ребров Л. Б., Мине-
ева М. Ф., Скуридин С. Г., Евдокимов Ю. М. Комп-
лексный подход к изучению механизмов действия
противомикробных и противовирусных средств. *Хи-
мико-фармацевтический журнал*. 2008;42(3):3–8. DOI:
10.30906/0023-1134-2008-42-3-3-8.
- Миронов А. Н., ред. Руководство по проведению до-
клинических исследований лекарственных средств. М.:
Гриф и К; 2012. С. 843–853.
- Theoharides T. C. COVID-19, pulmonary mast cells, cy-
tokine storms, and beneficial actions of luteolin. *BioFac-
tors*. 2020;46(3):306–308. DOI: 10.1002/biof.1633.
- Fan W., Qian S., Qian P., Li X. Antiviral activity of luteo-
lin against Japanese encephalitis virus. *Virus Research*.
2016;220:112–116. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.04.021.
- Theerawatanasirikul S., Thangthamniyom N., Kuo C.-J.,
Semkum P., Phecharat N., Chankeeree P., Lekcharoensuk P.
Natural phytochemicals, luteolin and isoginkgetin, inhibit
3C protease and infection of FMDV, in silico and in vitro.
Viruses. 2021;13(11):2118. DOI: 10.3390/v13112118.
- Wu S., Wang H.-Q., Guo T.-T., Li Y.-H. Luteolin inhibits CVB3
replication through inhibiting inflammation. *Journal of
Asian natural products research*. 2020;22(8):762–773. DOI:
10.1080/10286020.2019.1642329.
- Yan H., Ma L., Wang H., Wu S., Huang H., Gu Z., Jiang J.,
Li Yu. Luteolin decreases the yield of influenza A virus in
vitro by interfering with the coat protein I complex exp-
ression. *Journal of Natural Medicines*. 2019;73:487–496.
DOI: 10.1007/s11418-019-01287-7.
- Wang S., Ling Y., Yao Yu., Zheng G., Chen W. Luteolin inhi-
bits respiratory syncytial virus replication by regulating
the MiR-155/SOCS1/STAT1 signaling pathway. *Virology
Journal*. 2020;17:187. DOI: 10.1186/s12985-020-01451-6.
- Men X., Li S., Cai X., Fu L., Shao Y., Zhu Y. Antiviral activity
of luteolin against Pseudorabies virus in vitro and in vivo.
Animals. 2023;13(4):761. DOI: 10.3390/ani13040761.
- Jia Q., Huang X., Yao G., Ma W., Shen J., Changm Y.,
Ouyangm H., He J. Pharmacokinetic Study of Thirteen In-
gredients after the Oral Administration of *Flos Chrysanthemi*
Extract in Rats by UPLC-MS/MS. *BioMed Research Inter-
national*. 2020;2020(1):8420409. DOI: 10.1155/2020/8420409.
- Xu Z.-L., Xu M.-Y., Wang H.-T., Xu Q.-X., Liu M.-Y., Jia C.-P.,
Geng F., Zhang N. Pharmacokinetics of eight flavo-
noids in rats assayed by UPLC-MS/MS after Oral Admi-
nistration of *Drynariae rhizoma* extract. *Journal of Ana-
lytical Methods in Chemistry*. 2018;2018(1):4789196. DOI:
10.1155/2018/4789196.
- Гуленков А. С., Мизина П. Г., Бахрушина Е. О., Барда-
ков А. И., Нюдочкин А. В. Фармацевтико-технологическое
исследование адсорбированного жидкого растительно-
го экстракта антимикробного действия. *Разработка и
регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):94–101.
DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-94-101.
- Гуленков А. С., Мизина П. Г. Сорбция и десорбция жид-
кого растительного экстракта. *Фармация*. 2019;68(4):27–
31. DOI: 10.29296/25419218-2019-04-04.
- Rezaei A., Varshosaz J., Fesharaki M., Farhang A., Jafa-
ri S. M. Improving the solubility and in vitro cytotoxicity
(anticancer activity) of ferulic acid by loading it into cyc-
lodextrin nanosponges. *International Journal of Nanome-
dicine*. 2019;14:4589–4599. DOI: 10.2147/IJN.S206350.
- Deng C., Gao C., Tian X., Chao B., Wang F., Zhang Y., Zou J.,
Liu D. Pharmacokinetics, tissue distribution and excre-
tion of luteolin and its major metabolites in rats: Meta-
bolites predominate in blood, tissues and are mainly
excreted via bile. *Journal of Functional Foods*. 2017;35:332–
340. DOI: 10.1016/j.jff.2017.05.056.

REFERENCES

- Lin L.-C., Pai Y.-F., Tsai T.-H. Isolation of luteolin and luteo-
lin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat
Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *Journal of agri-
cultural and food chemistry*. 2015;63(35):7700–7706. DOI:
10.1021/jf505848z.
- Makarova M. N. Bioavailability and metabolism of flavo-
noids. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2011;74(6):33–
40. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2011-74-6-33-40.
- Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Yu., Yamamoto H., Kinase N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. *FEBS letters*. 1998;438(3):220–224. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01304-0.

4. Cui X. X., Yang X., Wang H.-J., Rong X.-Y., Jing S., Xie Y.-H., Huang D.-F., Zhao C. Luteolin-7-O-glucoside present in lettuce extracts inhibits hepatitis B surface antigen production and viral replication by human hepatoma cells in vitro. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2425. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02425.
5. Caporali S., De Stefano A., Calabrese C., Giovannelli A., Pieri M., Savini I., Tesaro M., Bernardini S., Minieri M., Terrinoni A. Anti-inflammatory and active biological properties of the plant-derived bioactive compounds luteolin and luteolin 7-glucoside. *Nutrients*. 2022;14(6):1155. DOI: 10.3390/nu14061155.
6. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer Science & Business Media; 2012. P. 40.
7. Bykov V. A., Dubinskaya V. A., Rebrov L. B., Mineeva M. F., Skuridin S. G., Evdokimov Yu. M. Complex approach to investigation of the mechanisms of antimicrobial and antiviral drug action. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008;42(3):3–8. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2008-42-3-3-8.
8. Mironov A. N., editor. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Moscow: Grif and K; 2012. P. 843–853. (In Russ.).
9. Theoharides T. C. COVID-19, pulmonary mast cells, cytokine storms, and beneficial actions of luteolin. *BioFactors*. 2020;46(3):306–308. DOI: 10.1002/biof.1633.
10. Fan W., Qian S., Qian P., Li X. Antiviral activity of luteolin against Japanese encephalitis virus. *Virus Research*. 2016;220:112–116. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.04.021.
11. Theerawatanasirikul S., Thangthamniyom N., Kuo C.-J., Semkum P., Phecharat N., Chankeeree P., Lekcharoensuk P. Natural phytochemicals, luteolin and isoginkgetin, inhibit 3C protease and infection of FMDV, in silico and in vitro. *Viruses*. 2021;13(11):2118. DOI: 10.3390/v13112118.
12. Wu S., Wang H.-Q., Guo T.-T., Li Y.-H. Luteolin inhibits CVB3 replication through inhibiting inflammation. *Journal of Asian natural products research*. 2020;22(8):762–773. DOI: 10.1080/10286020.2019.1642329.
13. Yan H., Ma L., Wang H., Wu S., Huang H., Gu Z., Jiang J., Li Yu. Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex expression. *Journal of Natural Medicines*. 2019;73:487–496. DOI: 10.1007/s11418-019-01287-7.
14. Wang S., Ling Y., Yao Yu., Zheng G., Chen W. Luteolin inhibits respiratory syncytial virus replication by regulating the MiR-155/SOCS1/STAT1 signaling pathway. *Virology Journal*. 2020;17:187. DOI: 10.1186/s12985-020-01451-6.
15. Men X., Li S., Cai X., Fu L., Shao Y., Zhu Y. Antiviral activity of luteolin against Pseudorabies virus in vitro and in vivo. *Animals*. 2023;13(4):761. DOI: 10.3390/ani13040761.
16. Jia Q., Huang X., Yao G., Ma W., Shen J., Changm Y., Ouyangm H., He J. Pharmacokinetic Study of Thirteen Ingredients after the Oral Administration of *Flos Chrysanthemi* Extract in Rats by UPLC-MS/MS. *BioMed Research International*. 2020;2020(1):8420409. DOI: 10.1155/2020/8420409.
17. Xu Z.-L., Xu M.-Y., Wang H.-T., Xu Q.-X., Liu M.-Y., Jia C.-P., Geng F., Zhang N. Pharmacokinetics of eight flavonoids in rats assayed by UPLC-MS/MS after Oral Administration of *Drynariae rhizoma* extract. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2018;2018(1):4789196. DOI: 10.1155/2018/4789196.
18. Gulenkov A. S., Mizina P. G., Bakhrushina E. O., Bardakov A. I., Nyudochkin A. V. Pharmaceutical-technological Study of Adsorbed Liquid Plant Extract of Antimicrobial Activity. *Drug development & registration*. 2022;11(2):94–101. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-94-101.
19. Gulenkov A. S., Mizina P. G. Sorption and desorption of liquid plant extract. *Pharmacy*. 2019;68(4):27–31. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2019-04-04.
20. Rezaei A., Varshosaz J., Fesharaki M., Farhang A., Jafari S. M. Improving the solubility and in vitro cytotoxicity (anticancer activity) of ferulic acid by loading it into cyclodextrin nanosponges. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:4589–4599. DOI: 10.2147/IJN.S206350.
21. Deng C., Gao C., Tian X., Chao B., Wang F., Zhang Y., Zou J., Liu D. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion of luteolin and its major metabolites in rats: Metabolites predominate in blood, tissues and are mainly excreted via bile. *Journal of Functional Foods*. 2017;35:332–340. DOI: 10.1016/j.jff.2017.05.056.

Обзорная статья / Review article

УДК 615.31

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1755>



Исследование возможности контроля производства препаратов низко-молекулярного гепарина отечественными тест-системами (обзор)

А. Л. Берковский✉, Е. В. Сергеева, А. В. Суворов

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственное общество РЕНАМ» Межрегиональная благотворительная общественная организация инвалидов «Общество больных гемофилией». 125167, Россия, г. Москва, Нарышкинская аллея, д. 5, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Берковский Арон Леонидович. **E-mail:** aron_56@mail.ru

ORCID: А. Л. Берковский – <https://orcid.org/0000-0001-8213-1810>;

Е. В. Сергеева – <https://orcid.org/0000-0002-9137-343X>;

А. В. Суворов – <https://orcid.org/0000-0002-2314-8353>.

Статья поступила: 19.02.2024

Статья принята в печать: 12.08.2024

Статья опубликована: 16.08.2024

Резюме

Введение. Представлены данные о широком клиническом применении препаратов низкомолекулярного гепарина (НМГ), обуславливающим необходимость эффективного и качественного производства соответствующих фармацевтических средств. Выявленная вариабельность антикоагулянтной активности препаратов НМГ предполагает обеспечение производства валидированными методами контроля и аттестации. Цель работы заключается в изучении возможности контроля антикоагулянтной активности и оценки функциональной совместимости препаратов НМГ при применении отечественных тест-систем.

Текст. Представлены данные об аналитических характеристиках хромогенного и коагулометрических методов, выполняемых с помощью отечественных тест-систем. Показано соответствие их показателей существующим международным требованиям. Доказана возможность указанных методов правильно и воспроизводимо сертифицировать препараты НМГ. Полученные в рамках исследований биоэквивалентности результаты свидетельствуют о возможности коагулологических методик оценивать функциональную совместимость изучаемых препаратов НМГ.

Заключение. Представленные данные доказывают целесообразность проведения контроля производства и аттестации препаратов НМГ отечественными тест-системами.

Ключевые слова: низкомолекулярный гепарин, фармацевтические препараты, аттестация, промышленное производство, антикоагулянтная активность, хромогенные методы, коагулометрические методы, отечественные тест-системы

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

Вклад авторов. А. Л. Берковский – формулировка цели и задач обзора, организация поиска данных и их анализ, редактирование текста. Е. В. Сергеева – поиск источников информации, систематизация данных. А. В. Суворов – обеспечение логической связи цитируемой литературы, анализ представленных данных. Все авторы участвовали в написании текста.

Для цитирования: Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В. Исследование возможности контроля производства препаратов низкомолекулярного гепарина отечественными тест-системами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):138–145. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1755>

Study of the possibility of controlling the production of low-molecular-weight heparin preparations by domestic test systems (review)

Aron L. Berkovsky✉, Elena V. Sergeeva, Alexander V. Suvorov

SPA RENAM. 5/2, Naryshkinskaya Alley, Moscow, 125167, Russia

✉ **Corresponding author:** Aron L. Berkovsky. **E-mail:** aron_56@mail.ru

© Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В., 2024

© Berkovsky A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V., 2024

ORCID: Aron L. Berkovsky – <https://orcid.org/0000-0001-8213-1810>;
Elena V. Sergeeva – <https://orcid.org/0000-0002-9137-343X>;
Alexander V. Suvorov – <https://orcid.org/0000-0002-2314-8353>.

Received: 19.02.2024

Accepted: 12.08.2024

Published: 16.08.2024

Abstract

Introduction. The data on the wide clinical use of low-molecular-weight heparin (LMWH) preparations are presented, necessitating the need for efficient and high-quality production of appropriate pharmaceuticals. The revealed variability of anticoagulant activity of LMWH preparations implies the provision of production with validated methods of control and certification. The aim of the work is to study the possibility of control of anticoagulant activity and assessment of functional compatibility of LMWH preparations when using domestic test systems.

Text. The data on analytical characteristics of chromogenic and coagulometric methods performed with the help of domestic test systems are presented. Their parameters correspond with the existing international requirements. The possibility of the mentioned methods to certify LMWH preparations correctly and reproducibly is shown. The given research results testify to the possibility of clotting methods to determine the bioequivalence of the studied preparations of LMWH.

Conclusion. The presented data prove the expediency of production control and certification of LMWH preparations by domestic test systems.

Keywords: low molecular weight heparin, pharmaceutical preparations, certification, industrial production, anticoagulant activity, chromogenic methods, coagulometric methods, domestic test systems

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. Aron L. Berkovsky – formulation of the aim and objectives of the review, organisation of data search and analysis, text editing. Elena V. Sergeeva – search of information sources, systematization of data. Alexander V. Suvorov – ensuring logical connection of the cited literature, analyze the presented data. All authors participated in text content creation.

For citation: Berkovsky A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V. Study of the possibility of controlling the production of low-molecular-weight heparin preparations by domestic test systems. *Drug development & registration*. 2024;13(3):138–145. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1755>

ВВЕДЕНИЕ

В клинической практике в настоящее время широко применяются препараты низкомолекулярного гепарина (НМГ), что предполагает необходимость интенсификации их производства. В РФ лекарственные препараты НМГ производят из различных отечественных и импортных субстанций. Обеспечение эффективного производства таких препаратов требует контроля функциональной активности гепарина в исходной субстанции, полупродуктах и целевых препаратах НМГ. Обеспечение эффективности и качества получения фармацевтических препаратов НМГ требует применения методов контроля антикоагулянтной активности.

Цель работы заключается в исследовании возможности хромогенного и коагулологических методов, проводимых с помощью отечественных тест-си-

стем, определять антикоагулянтную активность и функциональную совместимость препаратов НМГ при контроле их производства.

НМГ, фармацевтические препараты, сертификация и контроль производства

Гепарин – это смесь линейных сульфатированных гликозаминогликанов с высокой плотностью отрицательного заряда [1, 2]. Наиболее значимым является наличие у гепарина антикоагулянтной активности, обусловленной его способностью в комплексе с антитромбином (АТ) III инактивировать сериновые протеазы, участвующие в свертывании крови [3, 4]. В присутствии гепарина АТIII быстро ингибирует активность факторов коагуляции (Ф) IIa (тромбин), IXa, Xa, XIa и XIIa. Наиболее специфичными для антикоагулянтной гепаринотерапии являются

низкомолекулярные, высокоаффинные фракции гепарина – НМГ, обладающий способностью ингибировать ФХа (анти-Ха-активность) и тромбин (анти-IIa-активность). НМГ получают различными способами, что определяет вариабельность антикоагулянтной активности его препаратов [3–5]. Эффективность клинического применения НМГ доказана при лечении (и профилактике) различных патологий сердечно-сосудистой системы, тромбозах и тромбоэмболиях, что обусловлено антикоагулянтной, противотромботической и противовоспалительной активностью используемых препаратов [3, 4, 6, 7]. Несмотря на хорошие клинические результаты, применение НМГ может вызывать такие побочные осложнения, как кровоточивость, повышение концентрации в крови аминотрансферазы, развитие гепарининдуцированной тромбоцитопении, аллергических реакций, остеопороза. Необходимо отметить, что терапевтическая активность гепаринов существенно варьирует между отдельными пациентами; межиндивидуальные различия относятся к антикоагулянтному действию и фармакодинамике применяемого препарата [3, 8]. Эти положения подчеркивают необходимость клинко-диагностической оценки, а также валидации производимых препаратов НМГ по антикоагулянтной активности. Официально утвержденными к клиническому применению препаратами НМГ являются бемипарин, цертопарин, далтепарин, эноксапарин, ардепарин, надропарин, парнапарин, ревипарин и тинзапарин [9, 10].

Определение функциональной активности гепарина является необходимым при производстве фармацевтических препаратов НМГ. Оценка результатов измерения активности гепарина в субстанциях, полупродуктах и целевых лекарственных средствах позволит обеспечивать эффективность производства и выпускать достоверно аттестованные препараты^{1,2} [11].

К основному стандартизированному методу определения гепарина в настоящее время относят хромогенный тест измерения степени ингибирования комплексом АТIII-гепарин ФХа и тромбина (анти-Ха- и анти-IIa-активность гепарина) [12]. Определение антикоагулянтной активности НМГ по степени инактивации ФХа (анти-Ха-активность) может быть проведено и с помощью коагулологических методов^{3,4}; к таким тестам относятся, в частно-

сти, Heptest (Haemachem, Франция) [13] и Реаклот-гепарин⁵.

Обеспечение качества производства компонентов системы гемостаза предъявляет соответствующие требования к определению биологически активного вещества в субстанциях и готовых лекарственных формах НМГ. К таким требованиям относятся: выбор специфических методов измерения; сертификация и чистота компонентов используемых тест-систем; аналитическая валидация применяемой методики по ряду характеристик (правильность, точность, воспроизводимость, линейность) [11, 14, 15]. Европейской фармакопеей 11.0⁶ рекомендованы хромогенные методы для количественной идентификации НМГ. Повышение точности и правильности результатов определения активности НМГ этими методами обеспечивается стандартизацией измерений в основном за счет применения соответствующих международных стандартов (МС) [3, 5, 12, 16].

Хромогенный метод анализа анти-Ха- и анти-IIa-активности препаратов НМГ

В России разработан и внедрен в практику контроля производства НМГ валидированный хромогенный метод и соответствующая тест-система (Ренапарин-тест) на основе полученных авторами высокоочищенных и аттестованных реагентов⁷ [17]. Данный метод тестирования позволяет измерять ингибиторную активность гепарина в препаратах и субстанциях НМГ как по конечной точке, так и по кинетике процесса. В тест-систему включены полученные авторами высокоочищенные тромбин (ФIIa) с удельной активностью более 2000 МЕ/мг, ФХа с удельной активностью 33–35 МЕ/мг и АТIII с фактором очистки аффинной хроматографией более 500. В созданный набор реагентов входят и специфические для ФХа и тромбина хромогенные субстраты ZdArgGlyArg-pNA и TosGlyProArg-pNA соответственно, синтезированные в РФ и имеющие по данным ВЭЖХ чистоту не менее 98 %. Компонентом набора являлся также рабочий стандартный образец (PCO) НМГ с аттестованными против МС НМГ анти-Ха- и анти-IIa-активностью, бычий сывороточный альбумин и концентрат буфера трис-NaCl. С помощью

¹ European Pharmacopoeia 4. Heparins, low-molecular-mass. 01/2002:0828. P. 1297–1299.

² European Pharmacopoeia 11.0. Heparins, low-molecular-mass. Council of Europe. Strasbourg; 2023.

³ TRS 823 – 32nd report of the WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. 1992. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/WHO_TRS_823. Accessed: 19.02.2024.

⁴ Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity Guidance for Industry. 2017. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Accessed: 19.02.2024.

⁵ Регистрационное удостоверение на медицинское изделие от 22 ноября 2016 года. ФСР 2011/12501. Набор реагентов для определения антиХа-активности гепарина коагулологическим методом («Реаклот-гепарин») по ТУ 9398-024-05595541-2011. Доступно по: <https://renam.ru/assets/regist/reaklot-geparin-ru.pdf>. Ссылка активна на 19.02.2024.

⁶ European Pharmacopoeia 11.0. Heparins, low-molecular-mass. Council of Europe. Strasbourg; 2023.

⁷ Регистрационное удостоверение на медицинское изделие от 23 сентября 2016 года. ФСР 2010/09152. Набор реагентов для определения активности низкомолекулярного гепарина (Ренапарин-тест) по ТУ 9398-033-05595541-2010. Доступно по: <https://renam.ru/assets/regist%202024/renaparin-test.pdf>. Ссылка активна на 19.02.2024.

указанных компонентов была сформирована тест-система для определения НМГ по рекомендуемому Европейской фармакопеей 11.0¹ методу. Оценку функциональных свойств НМГ в препаратах и субстанциях проводили по отношению активности анти-Ха/анти-IIa. Измерения осуществляли по схеме:

1. При определении анти-Ха-активности НМГ

АТIII (избыток) + НМГ $\Rightarrow$ АТIII-НМГ.

АТIII-НМГ + ФХа (избыток) $\Rightarrow$

$\Rightarrow$ АТIII-НМГ-ФХа+ФХа (остаток).

ФХа (остаток) + ФХа-субстрат-pNA $\Rightarrow$ Пептид + pNA.

2. При определении анти-IIa-активности НМГ

АТIII (избыток) + НМГ $\Rightarrow$ АТIII-НМГ.

АТIII-НМГ + ФIIa (избыток) $\Rightarrow$

$\Rightarrow$ АТIII-НМГ-ФIIa+ФIIa (остаток).

ФIIa (остаток) + ФIIa-субстрат-pNA $\Rightarrow$ Пептид + pNA.

Аттестацию проводили с помощью 3-го международного и британского стандартов НМГ: Low Molecular Weight Heparin International Standard (code 11/176, 1068 МЕ анти-Ха/ампула и 342 МЕ анти-IIa/ампула, 2013, NIBSC, Великобритания) и Low Molecular Weight Heparin British Standard CS30026 (NIBSC, Великобритания). При определении НМГ по конечной точке использовали планшетный спектрофотометр Multiscan EX (LabSystems, Финляндия), а при кинетическом измерении – автоматический анализатор ACL ELITE PRO (IL, США).

Согласно требованиям, предъявляемым к методам определения показателей системы гемостаза, была осуществлена аналитическая валидация Ренапарин-теста [2, 12, 14, 20, 15, 19]. Оценку правильности измерений функционально активного НМГ по величине отношения активности анти-Ха/анти-IIa с помощью разработанного теста провели на аттестованных по анти-IIa- и анти-Ха-активности британском и МС НМГ. Активность анти-Ха и анти-IIa в каждом стандарте определяли, используя в качестве калибратора другой стандарт. Правильность тестирования, то есть близость результатов измерений к истинными значениями анти-Ха- и анти-IIa-активности составила 97–99 %. Правильность тестирования оценивали также по сравнению результатов измерения определяемой активности НМГ предлагаемым методом и валидированной методикой с использованием реагентов фирмы Chromogenix (Швеция). Установлено, что в этом варианте валидации правильность измерений составила 98 %.

Для введения в создаваемую тест-систему РСО НМГ и с учетом доказанной правильности измерений была проведена количественная аттестация это-

го РСО; калибратором служил МС НМГ. РСО характеризовался величинами анти-IIa- и анти-Ха-активности $3,12 \pm 0,05$ МЕ/мл и $10,57 \pm 0,12$ МЕ/мл соответственно. Тестирование МС с помощью РСО НМГ как калибратора доказало правильность измерений при применении Ренапарин-теста и созданной тест-системы: относительная погрешность в этом случае не превышала 5 %.

Воспроизводимость метода оценивали по проведению анализа в лаборатории в разное время различными сотрудниками и при тестировании одних тех же образцов НМГ в других лабораториях. Различия результатов не превышали 8 %.

Аналитические характеристики разработанного метода определяли при тестировании МС НМГ, а также РСО НМГ и контрольных образцов, полученных из субстанции НМГ эноксапарин. Показано, что линейность значений анти-Ха-активности НМГ находилась в диапазоне от 0,2 до 0,04 МЕ/мл, а анти-IIa-активности – от 0,06 до 0,008 МЕ/мл; отклонение от линейности не превышало 4 и 6 % соответственно. Коэффициент вариации результатов определения анти-Ха- и анти-IIa-активности НМГ был не более 5 и 1,5 % соответственно. Чувствительность Ренапарин-теста по анти-Ха- и анти-IIa-активности, определяемая по ГОСТ Р 53022.2-2008, составляла 0,01 МЕ/мл. Допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии не превышал 5 %.

Авторы считают, что тестирование НМГ валидированным хромогенным, рекомендуемым Европейской фармакопеей методом с использованием отечественной тест-системы [19] соответствует предъявляемым к аналитическому контролю требованиям, и Ренапарин-тест может быть использован для контроля эффективности производства лекарственных препаратов НМГ.

Коагулометрические методы анализа препаратов НМГ

Для определения функциональной активности НМГ обычно применяют хромогенный метод, однако для анализа сопоставимости биологических аналогов с оригинальным препаратом FDA^{2,3} рекомендует коагулологические (ГепТест и АЧТВ) способы измерений. В РФ по существующим требованиям к лабораторному анализу было проведено сравнительное исследование биоаналогичного препарата «Эноксапарин натрия» и оригинального «Клексан», содер-

² Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity Guidance for Industry. 2017. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Accessed: 19.02.2024.

³ Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 2003. Available at: <https://eclipsesol.com/wp-content/uploads/Bioavailability.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

¹ European Pharmacopoeia 11.0. Heparins, low-molecular-mass. Council of Europe. Strasbourg; 2023.

жащих в качестве действующего вещества эноксапарин натрия^{1,2} [18]. В качестве клоттингового метода был выбран рекомендуемый для поставленных целей ГепТест. Фактически работа была проведена с полным аналогом ГепТеста – методом Реаклот-гепарин на основе отечественной тест-системы³. Наличие сопоставимости функциональной активности обоих препаратов доказывалось согласно современным требованиям^{4,5} [21].

Исследование было выполнено с использованием 6 серий препарата «Эноксапарин натрия» (раствор для п/к введения, 10000 МЕ анти-Ха/мл, ООО «Технология лекарств», Россия) и 5 серий препарата «Клексан» (раствор для п/к введения, 10 000 МЕ анти-Ха/мл, Sanofi, Франция). После разведения рабочие растворы препаратов содержали 1,0; 0,5 и 0,25 МЕ анти-Ха/мл.

Компонентами тест-системы являлись субстратная плазма с нормальным уровнем активности факторов свертывания как источник ФV, АТIII и фибриногена и реагент, содержащий смесь ФХа с фосфолипидами [18]. В качестве стандартного образца использовали МС НМГ (code 01/608, 2194 МЕ анти-Ха/ампула), NIBSC (Великобритания)⁶.

В коагулологическом ГепТесте на первом этапе происходит инактивация избытка ФХа комплексом АТIII-гепарин, а на втором после добавления ионов кальция определяют активность остаточного ФХа по времени свертывания плазмы. Измерение проводили на полуавтоматическом коагулометре BioMérieux Option 4 plus (Франция). Для статистической

обработки результатов использовали пакет STATISTICA 10.0, регрессионный и корреляционный анализы.

Метод ГепТест характеризуется способностью комплекса НМГ + АТIII ингибировать экзогенный ФХа при использовании 100 % субстратной плазмы. Результаты ГепТеста позволяют оценивать функциональную активность и полноценность препаратов НМГ. При определении метрологических характеристик ГепТеста было показано, что относительное стандартное отклонение внутри одной серии в присутствии НМГ не превышало 2,75 %, а чувствительность метода составила 0,01 МЕ анти-Ха/мл плазмы. При исследовании сопоставимости препаратов эноксапарина натрия использовали рекомендации FDA^{7,8}, по которым сопоставимыми являются препараты, если результаты измерений всех проанализированных серий изучаемого биоаналога находятся в интервале:

$$M \pm 3\sigma,$$

где M – выборочное среднее значение времени свертывания по всем сериям оригинального препарата; σ – стандартное квадратичное отклонение для результатов оригинального препарата.

При сравнительном изучении препаратов НМГ в тех же условиях анализировали разведения МС НМГ. Графики зависимости времени свертывания от анти-Ха-активности сравниваемых препаратов были одинаковыми во всем диапазоне исследуемых концентраций, что указывает на сопоставимость их влияния на время свертывания. Были определены средние значения времени свертывания плазмы для каждого разведения препарата «Клексан» и «Эноксапарин натрия» и стандартное отклонение σ . Показано, что результаты тестирования исследуемых серий «Эноксапарина натрия» находились в интервале $M \pm 3\sigma$ для препарата «Клексан», что подтверждает функциональную сопоставимость этих фармацевтических средств.

Таким образом, метод ГепТест, выполненный с использованием отечественной тест-системы, позволил доказать сопоставимость «Эноксапарина натрия» и «Клексана». Аналогичность графиков зависимости времени свертывания от активности сравниваемых НМГ и отсутствие достоверных различий между коэффициентами корреляции результатов количественной оценки изучаемых препаратов свидетельствовали о сопоставимом антикоагулянтном действии эноксапарина натрия, содержащегося в исследуемых препаратах.

⁷ Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity Guidance for Industry. 2017. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Accessed: 19.02.2024.

⁸ Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 2003. Available at: <https://eclipsesol.com/wp-content/uploads/Bioavailability.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

¹ Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 2003. Available at: <https://eclipsesol.com/wp-content/uploads/Bioavailability.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

² European Pharmacopoeia 9.5. Nadroparin calcium. 5731-5733.

³ Регистрационное удостоверение на медицинское изделие от 22 ноября 2016 года. ФСР 2011/12501. Набор реагентов для определения антиХа-активности гепарина коагулологическим методом («Реаклот-гепарин») по ТУ 9398-024-05595541-2011. Доступно по: <https://renam.ru/assets/regist/reaklot-heparin-ru.pdf>. Ссылка активна на 19.02.2024.

⁴ Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity Guidance for Industry. 2017. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Accessed: 19.02.2024.

⁵ Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 2003. Available at: <https://eclipsesol.com/wp-content/uploads/Bioavailability.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

⁶ WHO International Standard 2nd International Standard for Low Molecular Weight Heparin NIBSC code: 01/608 Instructions for use (Version 2.0, Dated 01/04/2008). Available at: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/01-608.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

Изучена также возможность применения при анализе сопоставимости препаратов НМГ коагулологического метода активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), проводимого с помощью отечественных реагентов¹. АЧТВ является интегрированным тестом для анализа внутреннего и общего путей свертывания крови. Добавление к плазме препаратов гепарина активирует в ней АТIII, что ведет к ингибированию основных сериновых протеаз коагуляционного каскада и удлинению времени свертывания.

Определяли влияние различных концентраций в субстратной плазме человека МС НМГ на величину АЧТВ. Каждая концентрация НМГ была проанализирована 16 раз.

Как видно из рисунка 1, значение АЧТВ зависело от активности НМГ и описывалось кривой с уравнением линии тренда

$$y = 3,5116x^2 + 22,176x + 37,522$$

с коэффициентом корреляции линии тренда $R^2 = 0,9997$. Стандартное отклонение в одной серии не превышало 2,34 с, а коэффициент вариации составлял не более 2,60 %.

В рамках исследования биоэквивалентности было проведено определение антикоагулянтной активности «Надропарина кальция»² (ООО «Технология лекарств», Россия) и «Фраксипарина» (Aspen Pharma Trading Limited, Ирландия) с помощью указанной отечественной тест-системы. При этом определяли антикоагулянтную активность в 3 сериях «Фраксипарина» и в 3 сериях «Надропарина кальция» АЧТВ-тестом и вычисляли интервал $M \pm 3\sigma$ [7]. Как видно из рисунка 2, выборочные средние времена свертывания плазмы в обоих разведениях препарата «Надропарин кальция» находились в диапазоне $M \pm 3\sigma$, определенном для 3 серий препарата «Фраксипарин», что свидетельствует о сопоставимости исследованных препаратов.

Форма кривых зависимости времени свертывания плазмы от антикоагулянтной активности надропарина кальция была аналогична для препаратов «Надропарин кальция» и «Фраксипарин», что свидетельствует о сопоставимом влиянии надропарина кальция, содержащегося в обоих исследуемых препаратах.

¹ Регистрационное удостоверение на медицинское изделие от 23 сентября 2016 года. ФСР 2009/04598. Набор реагентов для определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ-тест) по ТУ 9398-017-05595541-2009. Доступно по: <https://renam.ru/assets/regist/achtv-test-2016-ru.pdf>. Ссылка активна на 19.02.2024.

² Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products – General considerations. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 2003. Available at: <https://eclipsesol.com/wp-content/uploads/Bioavailability.pdf>. Accessed: 19.02.2024.

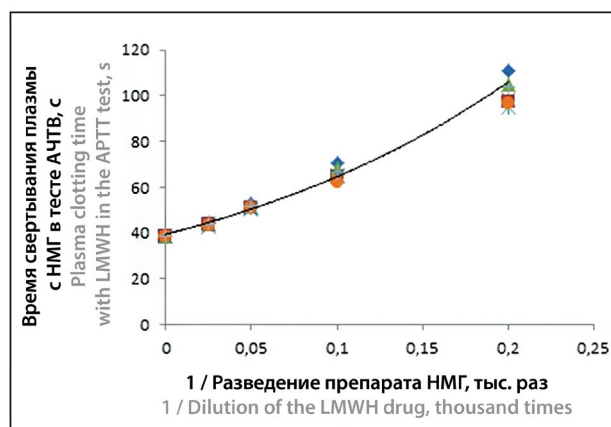


Рисунок 1. Зависимость времени свертывания плазмы в тесте активированного частичного тромбопластинового времени от разведения трех серий препаратов «Фраксипарин» и «Надропарин кальция»

Figure 1. Dependence of plasma clotting time in the activated partial thromboplastin time test on dilution of three series of Fraxiparin and Nadroparin calcium preparations

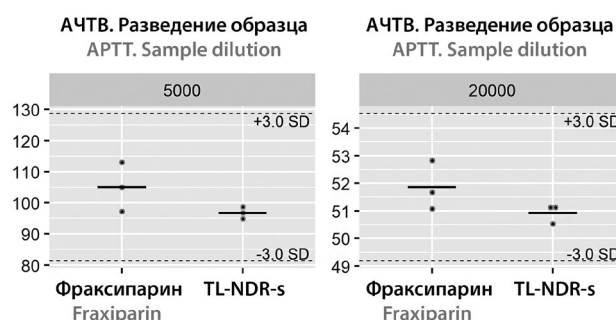


Рисунок 2. Графическая оценка сопоставимости препаратов «Фраксипарин» и «Надропарин кальция» (TL-NDR-s) методом активированного частичного тромбопластинового времени

Figure 2. Graphical assessment of comparability of Fraxiparin and Nadroparin calcium (TL-NDR-s) preparations by the activated partial thromboplastin time method

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов проведенных исследований по определению антикоагулянтной активности препаратов НМГ можно заключить:

1. Для определения анти-Ха- и анти-IIa-активности НМГ хромогенным методом разработана отечественная тест-система Ренапарин-тест. Ее аналитические характеристики соответствовали предъявляемым требованиям к правильности, чувствительности и воспроизводимости. Указанный метод может быть применен для аттестации препаратов НМГ.

- В рамках исследований биоэквивалентности показана возможность определения функциональной совместимости оригинального и аналогового препаратов НМГ коагулометрическими методами с помощью отечественных тест-систем Реаклот-гепарин и АЧТВ-тест.

Таким образом, применение соответствующих отечественных тест-систем позволит обеспечить контроль качества и эффективность производства фармацевтических препаратов НМГ в РФ.

ЛИТЕРАТУРА

- Зубаиров Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань: ФЭН; 2000. С. 219–240.
- Kitchen S., Olson J. D., Preston F. E., editors. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2009. P. 170–178.
- Qiu M., Huang S., Luo C., Wu Z., Liang B., Huang H., Ci Z., Zhang D., Han L., Lin J. Pharmacological and clinical application of heparin progress: An essential drug for modern medicine. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021;139:111561. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111561.
- Савельева К. Р., Фруммин Л. Е., Шестаков В. Н. Гепарин и низкомолекулярные гепарины. *Вестник службы крови России*. 2013;4:46–52.
- Hirsh J. Low Molecular Weight Heparins. 4th ed. Hamilton: BC Decker; 2007.
- Guo J. W. S. J., Zhong G. Y. S. X. Guidelines for rational drug use in coronary heart disease. 2nd edition. *Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science*. 2018;10:1–130.
- Gee E. The National VTE Exemplar Centres Network response to implementation of updated NICE guidance: venous thromboembolism in over 16s: reducing the risk of hospital-acquired deep vein thrombosis or pulmonary embolism (NG89). *British Journal of Haematology*. 2019;186(5):792–793. DOI: 10.1111/bjh.16010.
- Bloemen S., Hemker H. C., Al Dieri R. Large inter-individual variation of the pharmacodynamic effect of anticoagulant drugs on thrombin generation. *Haematologica*. 2013;98(4):549–554. DOI: 10.3324/Haematol.2012.073601.
- Cosmi B., Palareti G. Old and new heparins. *Thrombosis Research*. 2012;129(3):388–391. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.008.
- Onishi A., Ange K., Dordick J. S., Linhardt R. J. Heparin and anticoagulation. *Frontiers in Bioscience*. 2016;21:372–392.
- Hemker H. C. A century of heparin: past, present and future. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14(12):2329–2338. DOI: 10.1111/jth.13555.
- Hoffman M. Heparins: clinical use and laboratory monitoring. *Laboratory Medicine*. 2010;41(10):621–626. DOI: 10.1309/LMSXWC3A4LBIP2B.
- Bara L., Combe-Tamzali S., Conard J., Horellou M. H., Samama M. Laboratory monitoring of low molecular weight heparin (enoxaparin) with a new clotting test (Heptest). *Haemostasis*. 1987;17(3):127–133. DOI: 10.1159/000215570.
- Gosselin R. C., Adcock D., Dorgalaleh A., Favaloro E. J., Lippi G., Pego J. M., Regan I., Siguret V. International council for standardization in haematology recommendations for hemostasis critical values, tests, and reporting. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2020;46(4):398–409. DOI: 10.1055/s-0039-1697677.
- Gardiner C., Coleman R., de Maat M. P. M., Dorgalaleh A., Echenagucia M., Gosselin R. C., Ieko M., Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the evaluation of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 1: Instrument-specific issues and commonly used coagulation screening tests. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2021;43(2):169–183. DOI: 10.1111/ijlh.13411.
- Hirsh S., Anand S. S., Halperin J. L., Fuster V. Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 2001;103(24):2993–3018. DOI: 10.1161/01.cir.103.24.2994.
- Берковский А., Сергеева Е., Макаров В., Дрозд Н., Козлов А., Градова Ю., Суворов А. Межрегиональная благотворительная общественная организация инвалидов «Общество больных гемофилией», патентообладатель. Способ получения очищенного активированного фактора X свертывания крови. Российская Федерация патент RU 2221578C1. 27 апрель 2004.
- Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В., Мелкумян А. Л., Козлов А. А., Нешкова Е. А., Яровая Г. А. Методы определения активности гепарина. М.: РМАПО; 2015. С. 32–44.
- Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В., Козлов А. А. Тестирование активности низкомолекулярного гепарина в препаратах и субстанциях. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012;46(4):50–53.
- Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Чернобровкин М. Г., Зинченко А. В. Сравнительный анализ двух препаратов эноксапарина натрия методом ГепТест. *Химико-фармацевтический журнал*. 2022;56(10):63–66.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.

REFERENCES

- Zubairov D. M. The molecular basis of blood clotting and thrombus formation. Kazan: FEN; 2000: P. 219–240. (In Russ.)
- Kitchen S., Olson J. D., Preston F. E., editors. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2009. P. 170–178.
- Qiu M., Huang S., Luo C., Wu Z., Liang B., Huang H., Ci Z., Zhang D., Han L., Lin J. Pharmacological and clinical application of heparin progress: An essential drug for modern medicine. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021;139:111561. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111561.
- Savelyeva K. R., Frumin L. E., Shestakov V. N. Heparin and low molecular weight heparins. *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2013;4:46–52. (In Russ.)
- Hirsh J. Low Molecular Weight Heparins. 4th ed. Hamilton: BC Decker; 2007.
- Guo J. W. S. J., Zhong G. Y. S. X. Guidelines for rational drug use in coronary heart disease. 2nd edition. *Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science*. 2018;10:1–130.
- Gee E. The National VTE Exemplar Centres Network response to implementation of updated NICE guidance: venous thromboembolism in over 16s: reducing the risk of hospital-acquired deep vein thrombosis or pulmonary embolism (NG89). *British Journal of Haematology*. 2019;186(5):792–793. DOI: 10.1111/bjh.16010.

8. Bloemen S., Hemker H. C., Al Dieri R. Large inter-individual variation of the pharmacodynamic effect of anticoagulant drugs on thrombin generation. *Haematologica*. 2013;98(4):549–554. DOI: 10.3324/Haematol.2012.073601.
9. Cosmi B., Palareti G. Old and new heparins. *Thrombosis Research*. 2012;129(3):388–391. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.008.
10. Onishi A., Ange K., Dordick J. S., Linhardt R. J. Heparin and anticoagulation. *Frontiers in Bioscience*. 2016;21:372–392.
11. Hemker H. C. A century of heparin: past, present and future. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14(12):2329–2338. DOI: 10.1111/jth.13555.
12. Hoffman M. Heparins: clinical use and laboratory monitoring. *Laboratory Medicine*. 2010;41(10):621–626. DOI: 10.1309/LMSXWC3A4LBIP2B.
13. Bara L., Combe-Tamzali S., Conard J., Horellou M. H., Samama M. Laboratory monitoring of low molecular weight heparin (enoxaparin) with a new clotting test (Heptest). *Haemostasis*. 1987;17(3):127–133. DOI: 10.1159/000215570.
14. Gosselin R. C., Adcock D., Dorgalaleh A., Favaloro E. J., Lippi G., Pego J. M., Regan I., Siguret V. International council for standardization in haematology recommendations for hemostasis critical values, tests, and reporting. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2020;46(4):398–409. DOI: 10.1055/s-0039-1697677.
15. Gardiner C., Coleman R., de Maat M. P. M., Dorgalaleh A., Echenagucia M., Gosselin R. C., Ieko M., Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the evaluation of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 1: Instrument-specific issues and commonly used coagulation screening tests. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2021;43(2):169–183. DOI: 10.1111/ijlh.13411.
16. Hirsh S., Anand S. S., Halperin J. L., Fuster V. Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 2001;103(24):2993–3018. DOI: 10.1161/01.cir.103.24.2994.
17. Berkovsky A., Sergeeva E., Makarov V., Drozd N., Kozlov A., Gradova Yu., Suvorov A., Interregional charitable public organization of disabled people "Society of Hemophilia Patients", patent holder. Method for obtaining purified activated blood coagulation factor X. Patent RUS 2221578C1. 27 April 2004. (In Russ.)
18. Berkovsky A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V., Melkumyan A. L., Kozlov A. A., Neshkova E. A., Yarovaya G. A. Methods for determining the activity of heparin. Moscow: RMAPO; 2015. P. 32–44. (In Russ.)
19. Berkovskii A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V., Kozlov A. A. Evaluating activity of low-molecular-weight heparin in preparations and substances. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46(4):50–53 (In Russ.)
20. Berkovskii A. L., Sergeeva E. V., Chernobrovkin M. G., Zinchenko A. V. Comparative analysis of two enoxaparin sodium preparations by the Heptest method. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(10):63–66. (In Russ.)
21. Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Part 1. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)



Биорелевантный тест для таблеток подъязычных с глицином в среде растворения «искусственная слюна»

С. Д. Куликова^{1, 2✉}, М. Б. Сокол³, Ж. М. Козлова², П. А. Лосенкова^{2, 4},
П. Я. Паршинова¹, А. М. Полуянов^{2, 4}

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

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

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН). 119334, Россия, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

⁴ Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс». 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8., помещ. 1/2

✉ Контактное лицо: Куликова Софья Дмитриевна. E-mail: s.kulikova@cpha.ru

ORCID: С. Д. Куликова – <https://orcid.org/0009-0001-7712-3418>;
М. Б. Сокол – <https://orcid.org/0000-0002-1976-1972>;
Ж. М. Козлова – <https://orcid.org/0000-0003-1525-732X>;
П. А. Лосенкова – <https://orcid.org/0009-0005-2391-5267>;
П. Я. Паршинова – <https://orcid.org/0009-0005-7643-4192>;
А. М. Полуянов – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>.

Статья поступила: 30.04.2024

Статья принята в печать: 05.06.2024

Статья опубликована: 06.06.2024

Резюме

Введение. Биорелевантные среды растворения воссоздают состав содержимого желудочно-кишечного тракта. Они используются в качестве среды растворения при оценке профилей растворения различных лекарственных форм. Имитированные биологические жидкости позволяют прогнозировать результаты испытаний *in vivo*. Разработка состава имитированной слюнной жидкости позволяет оценить свойства лекарственного препарата в физиологически релевантных условиях.

Цель. Оценка высвобождения лекарственного препарата «глицин, таблетки подъязычные, 100 мг» отечественного производства в среду растворения Simulated Saliva 5, pH 6,8.

Материалы и методы. Для анализа использовались препараты: «Глицин, таблетки подъязычные, 100 мг» отечественного производства с действующим сроком годности. Тест сравнительной кинетики растворения проводили на приборе для теста «Растворение» DT 6 (ERWEKA GmbH, Германия). Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Waters W1525 Binary HPLC Pump (Waters Corporation, США), оснащенный термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором Waters 2487 Dual Absorbance Detector (Waters Corporation, США). Детектирование проводилось при длине волны 254 ± 2 нм после дериватизации молекулы глицина 4-толуолсульфонилхлоридом. Использовали колонку Grace Platinum C18-EPS, $4,6 \times 250$ мм, 5 мкм (Grace, США) и предколонку Grace Platinum C18-EPS, $4,6 \times 250$ мм, 5 мкм (Grace, США). Для исследования использовалось следующее программное обеспечение: валидированная автоматическая таблица Microsoft Excel для расчета значений высвобождения глицина.

Результаты и обсуждение. Разработана и валидирована методика количественного определения глицина в рамках ТСРП в среде воды очищенной и среде, имитирующей слюну человека, Simulated Saliva 5, pH 6,8. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 10–110 % от номинальной концентрации лекарственной формы в объеме среды 300 мл. Разработанная аналитическая методика была апробирована в ходе проведения биопредиктивного *in vitro* теста препаратов глицина. При проведении исследования в среде Simulated Saliva для лекарственных препаратов были получены более дискриминативные данные по сравнению со средой растворения «вода очищенная», что выражалось в разной скорости растворения, кривизне наклона профиля растворения и времени выхода на плато.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения для проведения биопредиктивных тестов таблеток «Глицин, таблетки подъязычные, 100 мг». Аналитический диапазон методики составил 10–110 % от номинальной концентрации лекарственной формы в объеме среды 300 мл. Результаты проведения теста в среде искусственной слюны обладали большей дискриминативностью в сравнении с водой очищенной и позволили обнаружить различия в полноте высвобождения лекарственных препаратов, времени достижения плато и угла наклона кривой профиля растворения.

© Куликова С. Д., Сокол М. Б., Козлова Ж. М., Лосенкова П. А., Паршинова П. Я., Полуянов А. М., 2024

© Kulikova S. D., Sokol M. B., Kozlova Z. M., Losenkova P. A., Parshinova P. Ya., Poluyanov A. M., 2024

Ключевые слова: тест сравнительной кинетики растворения, глицин, Simulated Saliva

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

Вклад авторов. С. Д. Куликова, Ж. М. Козлова, А. М. Полуянов придумали и разработали эксперимент. С. Д. Куликова, П. А. Лосенкова и М. Б. Сокол провели исследование методом ВЭЖХ-УФ и тест сравнительной кинетики растворения. С. Д. Куликова, и П. Я. Паршинова участвовали в обработке данных. С. Д. Куликова, Ж. М. Козлова, А. М. Полуянов участвовали в написании текста статьи. А. М. Полуянов был руководителем данного исследования. В обсуждении результатов участвовали все авторы.

Для цитирования: Куликова С. Д., Сокол М. Б., Козлова Ж. М., Лосенкова П. А., Паршинова П. Я., Полуянов А. М. Биорелевантный тест для таблеток подъязычных с глицином в среде растворения «искусственная слюна». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):146–155. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1823>

A biorelevant test for tablets glycine sublingual in the "simulated saliva" dissolution medium

Sofya D. Kulikova^{1,2✉}, Maria B. Sokol³, Zhanna M. Kozlova², Polina A. Losenkova^{2,4},
Polina Ya. Parshinova¹, Andrey M. Poluyarov^{2,4}

¹ Limited Liability Company "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopolsky bulvar, 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 N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS (IBCP RAS). 4, Kosygina str., Moscow, 119334, Russia

⁴ Limited Liability Company "Scientific Compliance". 1/2, 8, Simferopolsky bulvar, Moscow, 117246, Russia

✉ **Corresponding author:** Sofya D. Kulikova. **E-mail:** s.kulikova@cpha.ru

ORCID: Sofya D. Kulikova – <https://orcid.org/0009-0001-7712-3418>;

Maria B. Sokol – <https://orcid.org/0000-0002-1976-1972>;

Zhanna M. Kozlova – <https://orcid.org/0000-0003-1525-732X>;

Polina A. Losenkova – <https://orcid.org/0009-0005-2391-5267>;

Polina Ya. Parshinova – <https://orcid.org/0009-0005-7643-4192>;

Andrey M. Poluyarov – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>.

Received: 30.04.2024

Accepted: 05.06.2024

Published: 06.06.2024

Abstract

Introduction. Biorelevant dissolution media reconstitute the composition of the contents of the gastrointestinal tract. They are used as dissolution media in the evaluation of dissolution profiles of different dosage forms. Simulated biological fluids allow prediction of *in vivo* test results. The development of the composition of simulated salivary fluid allows the evaluation of drug properties under physiologically relevant conditions.

Aim. Evaluation of the release of the drug product "glycine, sublingual tablets, 100 mg", domestically produced in Simulated Saliva 5 pH 6.8.

Materials and methods. The preparations used for analysis were: «Glycine, sublingual tablets, 100 mg», domestically produced with valid expiration date. Comparative dissolution kinetics test was carried out on the dissolution test apparatus DT 6 (ERWEKA GmbH, Germany). Chromatographic separation and detection were performed on a Waters W1525 Binary HPLC Pump high-performance liquid chromatograph (Waters Corporation, USA) equipped with column and sample thermostat, degasser, autosampler and Waters 2487 Dual Absorbance Detector (Waters Corporation, USA). Detection was performed at a wavelength of 254 ± 2 nm after derivatization of the glycine molecule with 4-toluenesulfonyl chloride. A Grace Platinum C18-EPS 5 μ m 4.6 $\times$ 250 mm Grace Platinum C18-EPS 5 μ m 4.6 $\times$ 250 mm column (Grace, USA) and a Grace Platinum C18-EPS 5 μ m 4.6 $\times$ 250 mm pre-column (Grace, USA) were used. The following software was used for the study: validated Microsoft Excel spreadsheet for calculating glycine release values.

Results and discussion. The technique for quantitative determination of glycine was developed and validated under CDKT in purified water medium and Simulated Saliva 5 pH 6.8. The validated analytical range of the methodology was 10–110 % of the nominal concentration of the dosage form in 300 mL volume of medium. The developed analytical technique was validated in the biopredictive *in vitro* test of glycine preparations. During the study in Simulated Saliva medium for drug formulations, more discriminative data were obtained, which were expressed as: different dissolution rate, curvature of the slope of the dissolution profile and time to reach the plateau in contrast to the dissolution medium purified water.

Conclusion. The quantification technique was developed and validated for biopredictive tests of tablets "Glycine, sublingual tablets, 100 mg". The analytical range of the technique was 10–110 % of the nominal concentration of the dosage form in 300 mL volume of medium. The results of the test in artificial saliva medium were more discriminatory.

Keywords: test comparative dissolution kinetics, glycine, Simulated Saliva

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. Sofya D. Kulikova, Zhanna M. Kozlova, Andrey M. Poluyanov invented and designed the experiment. Sofya D. Kulikova, Polina A. Losenkova and Maria B. Sokol analyze on HPLC-UV. Sofya D. Kulikova and Polina A. Losenkova and Maria B. Sokol performed a comparative dissolution kinetics test. Sofya D. Kulikova and Polina Ya. Parshinova participated in data processing. Sofya D. Kulikova, Zhanna M. Kozlova, Andrey M. Poluyanov participated in writing the text of the article. Andrey M. Poluyanov was the leader of this study. All authors participated in discussion of the results.

For citation: Kulikova S. D., Sokol M. B., Kozlova Z. M., Losenkova P. A., Parshinova P. Ya., Poluyanov A. M. A biorelevant test for tablets glycine sublingual in the «simulated saliva» dissolution medium. *Drug development & registration*. 2024;13(3):146–155. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1823>

ВВЕДЕНИЕ

Биорелевантные среды растворения (БРС) – это искусственно созданные среды, воспроизводящие состав содержимого желудочно-кишечного тракта человека, релевантные по таким свойствам, как pH, осмолярность, вязкость, буферная емкость и поверхностное натяжение [1–3]. БРС позволяют в условиях *in vitro* прогнозировать результаты испытаний *in vivo* [4].

В рамках фармацевтической разработки существует отдельная методология, посвященная средам растворения, имитирующим ротовую полость [5]. Для лучшей имитации слюны человека среды должны иметь значение pH, приближенное к физиологическому [6]. Диапазон pH человеческой слюны варьируется в интервале 6,4–7,4, поскольку зависит от таких факторов, как особенности питания, скорость секреции и гигиенического состояния полости рта [7, 8]. При этом отдельно стоит отметить, что на величину pH может также оказывать влияние употребление напитков с pH, отличным от нейтрального, например кофе, который снижает значение pH [9].

Данные среды отличаются между собой буферной емкостью, а также кислотностью и используются для различных целей [10, 11]. Виды и особенности оральных биорелевантных сред указаны в таблице 1. Для изучения твердых лекарственных форм подходит состав 5, поскольку он разрабатывался для прогнозирования высвобождения пероральных лекарственных препаратов.

Наиболее распространенными компонентами при создании среды, имитирующей слюну человека, являются: соли, например хлориды, карбонаты и фосфаты, которые нужны для поддержания оптимального уровня pH, осмотической активности и ионной силы; белки, такие как амилаза и муцин, необходимые для воссоздания условий ротовой полости человека [10]. Физиологичный объем выделяемой слюны у человека находится в диапазоне 1–2 литра в сутки [12]. В рамках теста объем был уменьшен до физиологи-

чески релевантного – 300 мл, который, кроме того, является минимально возможным объемом для тестера «Растворение» DT 6 (ERWEKA GmbH, Германия).

Особое значение данные среды играют в рамках испытаний для сублингвальных и трансбукальных лекарственных препаратов [13, 14]. Подъязычное или защечное применение препарата используется с целью получения систематического эффекта и является альтернативой системной доставке лекарственных средств [15]. Среди преимуществ этих лекарственных форм можно выделить быстроту действия и отсутствие эффекта первого прохождения через печень [16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: вода очищенная, тип 1; хлористоводородная кислота (HCl) концентрированная, класс «х.ч.» (ООО «Сигма Тек», Россия); уксусная кислота (CH₃COOH) ледяная, класс «RFE, USP, BP, Ph. Eur.» (PanReas AppliChem, США); ортофосфорная кислота (H₃PO₄) концентрированная, класс «for HPLC» (Scharlau, Испания); натрия гидроксид (NaOH), класс «ч.д.а.» (ООО «Компонент-Реактив», Россия); калий фосфорнокислый 2-зам. (K₂HPO₄), б/в, класс «ч.д.а.» (АО «ЛенРеактив», Россия); динатрий фосфорнокислый 2-зам (NaH₂PO₄), 2-вод., класс «ч.д.а.» (АО «ЛенРеактив», Россия); натрий фосфорнокислый 2-зам. (Na₂HPO₄), 12-вод., класс «pure EP» (NeoFroxx GmbH, Германия); ацетонитрил (ACN), класс «for UHPLC» (PanReas AppliChem, США); тозилхлорид (TsCl) (Merck KGaA, Германия); борная кислота, класс «х.ч.» (АО «ЛенРеактив», Россия).

Объектами анализа выступали три серии препарата «Глицин, таблетки подъязычные, 100 мг» отечественного производства, производитель с действующим сроком годности. Вспомогательные вещества для приготовления раствора были предоставлены производителем таблеток.

Таблица 1. Виды и характеристики биорелевантных сред растворения ротовой полости

Table 1. Types and characteristics of biorelevant oral dissolution media

Биорелевантная среда растворения, имитирующая слюнную жидкость Simulated Saliva (SS) Biorelevant dissolution medium Simulated Saliva (SS)	Характеристика Characteristics	Состав, г Composition, g
SS 1	Был разработан для изучения коррозионного поведения всех металлических материалов в стоматологии Was developed to study the corrosion behavior of all metallic materials in dentistry	хлорид калия – 0,720 дигидрат хлорида кальция – 0,220 хлорид натрия – 0,600 фосфат калия – 0,680 фосфат натрия – 0,866 гидрокарбонат калия – 1,500 тиоцианат калия – 0,060 лимонная кислота – 0,030 pH 6,5 potassium chloride – 0.720 calcium chloride dihydrate – 0.220 sodium chloride – 0.600 potassium phosphate – 0.680 sodium phosphate – 0.866 potassium bicarbonate – 1.500 potassium thiocyanate – 0.060 citric acid – 0.030 pH 6.5
SS 2	Был разработан для прогнозирования локального воздействия канцерогенных соединений, содержащихся в табачном дыме, на полость рта Was developed to predict localized oral exposure to carcinogenic compounds in tobacco smoke	хлорид калия – 0,720 дигидрат хлорида кальция – 0,220 хлорид натрия – 0,600 фосфат калия – 0,680 фосфат натрия – 0,866 гидрокарбонат калия – 1,500 тиоцианат калия – 0,060 лимонная кислота – 0,030 pH 7,4 potassium chloride – 0.720 calcium chloride dihydrate – 0.220 sodium chloride – 0.600 potassium phosphate – 0.680 sodium phosphate – 0.866 potassium bicarbonate – 1.500 potassium thiocyanate – 0.060 citric acid – 0.030 pH 7.4
SS 3	Был использован для прогнозирования результатов при изучении ополаскивателей для полости рта Was used to predict outcomes in a study of mouthwashes	дигидрат хлорида кальция – 0,228 хлорид натрия – 1,017 фосфат натрия – 0,204 магния хлорида гексагидрат – 0,061 карбоната калия гемигидрат – 0,603 моногидрат – 0,273 подчелюстной муцин – 1,000 альфа-амилаза – 2,000 calcium chloride dihydrate – 0.228 sodium chloride – 1.017 sodium phosphate – 0.204 magnesium chloride hexahydrate – 0.061 potassium carbonate hemihydrate – 0.603 sodium phosphate monohydrate – 0.273 submandibular mucin – 1.000 alpha-amylase – 2.000

Окончание таблицы 1

Биорелевантная среда растворения, имитирующая слюнную жидкость Simulated Saliva (SS) Biorelevant dissolution medium Simulated Saliva (SS)	Характеристика Characteristics	Состав, г Composition, g
SS 4	Был разработан для изучения взаимодействий между молекулами лекарств и слизистой оболочки полости рта Was developed to study interactions between drug molecules and the oral mucosa	хлорид калия – 0,149 хлорид натрия – 0,117 гидрокарбонат натрия – 2,100 альфа-амилаза – 2,000 желудочный муцин – 1,000 potassium chloride – 0.149 sodium chloride – 0.117 sodium bicarbonate – 2.100 alpha-amylase – 2.000 gastric mucin – 1.000
SS 5	Был разработан для мониторинга высвобождения пероральных быстрорастворимых лекарственных препаратов Was developed to monitor the release of oral fast-dissolving drugs	хлорид натрия – 8,00 фосфат калия – 0,19 фосфат натрия – 2,38 pH 6,8 sodium chloride – 8.00 potassium phosphate – 0.19 sodium phosphate – 2.38 pH 6.8

В качестве стандартного образца использовалась субстанция-порошок с чистотой 98,5 % (Россия), серия 016022023, с действующим сроком годности.

В качестве среды контроля качества использовалась вода очищенная.

Методика приготовления среды, имитирующей слюну человека, Simulated Saliva 5, pH 6,8

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 8,0 г натрия хлорида и растворяли в 200 мл воды очищенной. К полученному раствору прибавляли 0,19 г гидроортофосфата калия и 2,38 г дигидрофосфата натрия, доводили объем раствора до метки водой очищенной и тщательно перемешивали. Измеряли pH раствора на pH-метре, при необходимости доводили pH до значения 6,8 1 М раствором натрия гидроксида или 42,5%-й ортофосфорной кислотой [10].

Все полученные среды растворения фильтровали с помощью системы вакуумной фильтрации жидкостей и дегазировали с помощью вакуумного насоса.

Оборудование

Тест сравнительной кинетики растворения проводили на аппарате «лопастная мешалка» для теста «Растворение» DT 6 (ERWEKA GmbH, Германия) при скорости вращения 50 об/мин при температуре $37 \pm 0,5$ °C. Объем среды растворения воды очищенной составил 1000 мл. Объем среды растворения

Simulated Saliva 5, pH 6,8, составил 300 мл. Временные точки отбора проб: 5, 10, 15, 20, 30 мин. Количественное определение высвободившегося глицина проводили методом ВЭЖХ-УФ.

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Waters W1525 Binary HPLC pump (Waters Corporation, США), оснащенном ультрафиолетовым детектором Waters 2487 Dual Absorbance Detector (Waters Corporation, США). Использовали хроматографическую колонку Grace Platinum C18-EPS, 4,6 x 250 мм, 5 мкм (Grace, США).

Расчет полученных данных проводили при помощи валидированного программного обеспечения для работы на высокоэффективном жидкостном хроматографе Waters W1525 Binary HPLC pump с УФ-детектором (Waters Corporation, США).

Методики хроматографического разделения и детектирования были взяты из научных источников и доработаны под требования эксперимента [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики количественного определения

Для целей исследования была разработана и валидирована методика количественного определения глицина, позволяющая оценить процент высвобождения из твердой лекарственной формы в среду, имитирующую слюну человека; полученные результаты валидационных испытаний содержатся в таблице 2 [17–19].

Таблица 2. Основные валидационные характеристики
Table 2. Major validation characteristics

Валидационная характеристика Validation characteristics	Описание Description	Критерий приемлемости Acceptability criterion	Полученные результаты The results
Селективность Selectivity	Готовили 5 калибровочных растворов СО с известной концентрацией; растворы плацебо в среде растворения, растворы среды растворения с добавлением дериватизатора 5 calibration solutions were prepared of standard sample with known concentration; placebo solutions in dissolution medium, dissolution medium solutions with derivatizing agent added	На хроматограммах раствора для проверки специфичности должны отсутствовать пики с временами удерживания пика вещества глицина The chromatograms of the solution for the specificity test should show no peaks with retention times of the substance glycine peak	Соответствует Relevant
Градуировочная кривая (линейность) Graduation curve (linearity)	Калибровочные растворы готовили в диапазоне концентраций 10–110 % от номинальной для дозирования 100 мг Calibration solutions were prepared in the concentration range of 10–110 % of the nominal concentration for the dosage 100 mg	Коэффициент корреляции $r \geq 0,98$; –15 % $\leq E$, % ≤ 15 % – для концентрации на уровне НПКО, –10 % $\leq E$, % ≤ 10 % – для концентраций остальных точек Correlation coefficient $r \geq 0,98$; –15 % $\leq E$, % ≤ 15 % – for concentrations at the lower limit of quantification, –10 % $\leq E$, % ≤ 10 % – for concentrations of other points	Соответствует, аналитический диапазон составил от 10 до 110 % от номинальной концентрации глицина в таблетках 100 мг Relevant, the analytical range was 10 to 110 % of the nominal concentration of tablets glycine in 100 mg
Правильность Rightness	Готовили пять серий тест-растворов, последовательно используя в качестве растворителя среду растворения. Полученные растворы анализировали согласно условиям анализа Five series of test solutions were prepared, successively using the dissolution medium as a solvent. The obtained solutions were analyzed according to the conditions of analysis	–15 % $\leq E$, % ≤ 15 % – для концентрации на уровне НПКО, –10 % $\leq E$, % ≤ 10 % – для концентраций остальных точек –15 % $\leq E$, % ≤ 15 % – for concentrations at the lower limit of quantification, –10 % $\leq E$, % ≤ 10 % – for concentrations of other points	Соответствует, средний % открываемости лежит в границах доверительного интервала от 95,26 до 104,84 % Relevant, average % openability lies within the confidence interval from 95.26 to 104.84 %

Окончание таблицы 2

Валидационная характеристика Validation characteristics	Описание Description	Критерий приемлемости Acceptability criterion	Полученные результаты The results
Прецизионность Precision	Готовили пять серий тест-растворов, последовательно используя в качестве растворителя среду растворения. Полученные растворы анализировали согласно условиям анализа Five series of test solutions were prepared, successively using the dissolution medium as a solvent. The obtained solutions were analyzed according to the conditions of analysis	RSD ≤ 10 % – для концентрации на уровне НПКО, RSD ≤ 15 % – для концентраций остальных точек RSD ≤ 10 % – for concentrations at the lower limit of quantification, RSD ≤ 15 % – for concentrations of other points	Соответствует, относительное стандартное отклонение глицина не превышает установленного значения 4 % Relevant, the relative standard deviation of glycine does not exceed the set value of 4 %
Стабильность образцов при температуре 37 °С в течение 24 часов Stability of samples at 37 °C for 24 hours	Оценивали по изменению концентраций анализируемых растворов, используя для сравнения образцы 100 % уровня концентрации от номинала для дозировки 100 мг через 24 часа после их приготовления при комнатной температуре и при нагревании при 37 °С в сушильном шкафу (моделирование условий проведения ТСРР) It was evaluated by the change in concentrations of the analyzed solutions, using for comparison samples of 100 % concentration level from the nominal for 100 mg dosage 24 hours after their preparation at room temperature and when heated at 37 °C in a desiccator (simulation of CDKT conditions)	–10 % ≤ E, % ≤ 10 % – для концентраций анализируемого вещества –10 % ≤ E, % ≤ 10 % – for analyte concentrations	Соответствует, тест-растворы стабильны в течение 24 часов после их приготовления в условиях комнатной температуры и при температуре 37 °С в сушильном шкафу Relevant, test solutions are stable for 24 hours after preparation at room temperature and at 37 °C in a desiccator

Аналитический этап исследования

В рамках научной работы для одного из составов лекарственного препарата «Глицин, таблетки подъязычные, 100 мг» отечественного производства была проведена оценка высвобождения в среде, имитирующей слюну человека, в сравнении с аналогами, представленными на рынке. Полученные профили представлены в таблице 3.

При проведении исследования лекарственные препараты показали разную скорость растворения, угол наклона и время выхода на плато. Для препарата X и Y наблюдается достижение высвобождения к 30-й минуте проведения испытания. Скорость высвобождения препарата Y выше по сравнению с другими препаратами. Подъем профилей кривой X и Z происходит значительно медленнее, чем Y. Для всех лекарственных препаратов отмечено схожее относительное стандартное отклонение в конечной временной точке.

Отдельно стоит отметить результаты, полученные в среде искусственной слюны, которые представлены в таблице 4.

Данная среда растворения является дискриминативной и позволяет оценить различия в технологии получения готовой лекарственной формы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения для проведения биопредиктивных тестов таблеток «Глицин, таблетки подъязычные, 100 мг». Аналитический диапазон методики составил 10–110 % от номинальной концентрации лекарственной формы в объеме среды 300 мл. Результаты проведения теста в среде искусственной слюны обладали большей дискриминативностью в сравнении с водой очищенной и позволили обнаружить различия в полноте высвобождения лекарственных препаратов, времени достижения плато и угла наклона кривой профиля растворения.

Изучение сред растворения, которые имитируют ротовую полость, является важным аспектом в рамках проведения биорелевантных тестов для сублингвальных и трансбуккальных лекарственных форм.

Таблица 3. Результаты проведенных испытаний ТСКР

Table 3. Results of the CDKT

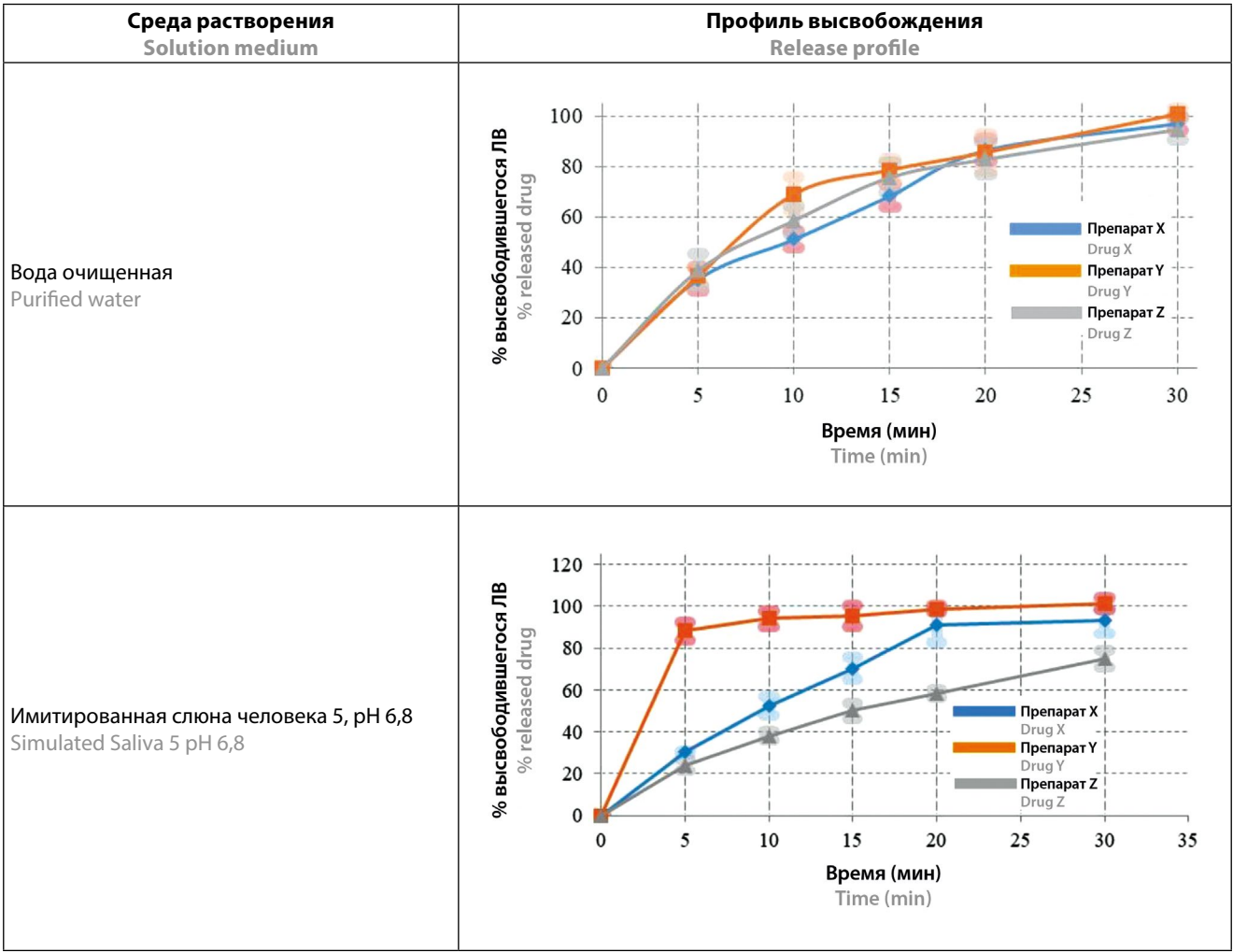


Таблица 4. Среднее значение количества глицина, высвободившегося в среду растворения Simulated Saliva 5, pH 6,8

Table 4. Average amount of glycine released into Simulated Saliva 5 pH 6.8

Препарат Drug	Полнота высвобождения, % Complete release, in %	Время выхода на плато, мин Time to reach the plateau, min	Значение RSD к 30-й минуте, % RSD value by 30 min, in %
X	к 15-й минуте – 71,55 к 30-й минуте – 97,80 by 15 minutes – 71.55 by 30 minutes – 97.80	20	4,32
Y	к 15-й минуте – 95,43 к 30-й минуте – 101,33 by 15 minutes – 95.43 by 30 minutes – 101.33	5	2,84
Z	к 15-й минуте – 50,01 к 30-й минуте – 75,04 by 15 minutes – 50.01 by 30 minutes – 75.04	Не наблюдается выход на плато Doesn't reach the plateau	5,31

ЛИТЕРАТУРА

1. Раменская Г. В., Шохин И. Е., Савченко А. Ю., Кулинич Ю. И., Давыдова К. Ц. Биофармацевтическая модель оценки взаимозаменяемости воспроизведенных ЛС по их растворимости, метаболизму и элиминации (BDDCS). *Биомедицина*. 2011;1(2):50–57.
2. Дружининская О. В., Смехова И. Е. Среды растворения, применяемые в разработке и контроле качества лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):144–150.
3. Slipchenko G. D., Hrudko V. O., Ruban O. A. Development of the methods for spectrophotometric determination of the flavonoid concentration in solution to study bioavailability of the amount of bioactive substances in capsules containing the powder of *Scutellaria baicalensis* roots and rhizomes. *News of Pharmacy*. 2017;2(30):31–36.
4. Раменская Г. В., Шохин И. Е., Савченко А. Ю., Волкова Е. А. Испытание «Растворение» в средах, моделирующих физиологические условия, как способ оценки поведения лекарственных средств *in vivo*. *Биомедицина*. 2011;57(5):482–489. DOI: 10.18097/PBMC20115705482.
5. Ali J., Lee J. B., Gittings S., Iachellini A., Bennett J., Cram A., Garnett M., Roberts C. J., Gershkovich P. Development and optimisation of simulated salivary fluid for biorelevant oral cavity dissolution. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2021;160:125–133. DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.01.017.
6. Викторова А. С., Елизарова Е. С., Романова Р. С., Тимергалиева В. Р., Хуторянский В. В., Мустафин Р. И. Интерполимерные комплексы на основе Carbopol® и поли(2-этил-2-оксазолина) как носители для трансбуккальной доставки метформина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):48–55. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-48-55.
7. Лихорад Е. В., Шаковец Н. В. Слюна: значение для органов и тканей в полости рта в норме и при патологии. *Медицинский журнал*. 2013;3:7–11.
8. Nadia F. H., Ismail A. Effect of 10 Gram Cheddar Cheese Consumption on Salivary pH – A Study of Dentistry Students of Sultan Agung Islamic University Semarang. *Odonto: Dental Jurnal*. 2014;1(1):34–38.
9. Oktanauli P., Zikir A. P., Taher P., Herawati M., Sean M. Effect of Robusta Coffee (*Coffea Canephora*) on the Degree of Acidity (pH) of Saliva. *International Journal of Clinical Science and Medical Research*. 2023;3(5):97–101. DOI: 10.55677/IJCSMR/V3I5-02/2023.
10. Marques M. R. C., Loebenberg R., Almukainzi M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technologies*. 2011;18(3):15–28. DOI: 10.14227/DT180311P15.
11. Wang Q., Gao C., Yang N., Nishinari K. Effect of simulated saliva components on the *in vitro* digestion of peanut oil body emulsion. *RSC Advances*. 2021;11(49):30520–30531. DOI: 10.1039/d1ra03274g.
12. Саркисян Н. Г., Катаева Н. Н., Хохрякова Д. А., Меликян С. Г. Оценка взаимосвязи физико-химических показателей слюны, типа питания и качества питьевой воды. *Врач*. 2022;33(7):68–71. DOI: 10.29296/25877305-2022-07-14.
13. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive Interpolyelectrolyte Complexes for the Buccal Delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018;10(1):85. DOI: 10.3390/polym10010085.
14. Харенко Е. А., Ларионова Н. И., Демина Н. Б. Мукоадгезивные лекарственные формы. *Химико-фармацевтический журнал*. 2009;43(4):21–29. DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-4-21-29.
15. Исаева Н. В., Тулайкин А. И., Шешегова Е. В. Таблетки. Нормативные требования государственной фармакопеи XIII издания. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):178–183.
16. Опрышко В. И., Носивец Д. С. Инновации, меняющие стереотипы фармакологии будущего. *Медицинские аспекты здоровья женщины*. 2016;2(98):43–47.
17. Полуянов А. М., Кочуг А., Митрофанова Л. С., Никитин И. Д., Вергасов О. Ю., Шохин И. Е., Фишер Е. Н. Разработка, валидация и апробация аналитической методики количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках проведения теста сравнительной кинетики растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):62–72. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-62-72.
18. Калмыков П. А., Кустова Т. П., Кустов С. О., Шестаковская П. С., Азметов Т. Р., Калмыкова А. А. *One-pot* определение аминокислот в лекарственных препаратах мето-

дом предколоночной дериватизации с фенилизотиоцианатом. *Тонкие химические технологии*. 2024;19(2):127–138. DOI: 10.32362/2410-6593-2024-19-2-127-138.

19. Аскретков А. Д., Клишин А. А., Зыбин Д. И., Орлова Н. В., Холодова А. В., Лобанова Н. В., Серегин Ю. А. Определение двадцати протеиногенных аминокислот и добавок в культуральной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Журнал аналитической химии*. 2020;75(8):721–729. DOI: 10.31857/S0044450220080034.

REFERENCES

1. Ramenskaya G. V., Shohin I. E., Savchenko A. U., Kulnich U. I., Davidova K. C. Biopharmaceutical model for the assessment of generic interchangeability (their solubility, metabolism and elimination) (BDDCS). *Biomedicine*. 2011;1(2):50–57. (In Russ.)
2. Druzhininskaya O. V., Smekhova I. E. Dissolution media used in development and quality control of drugs. *Drug development & registration*. 2017;3(3):144–150. (In Russ.)
3. Slipchenko G. D., Hrudko V. O., Ruban O. A. Development of the methods for spectrophotometric determination of the flavonoid concentration in solution to study bioavailability of the amount of bioactive substances in capsules containing the powder of *Scutellaria baicalensis* roots and rhizomes. *News of Pharmacy*. 2017;2(30):31–36.
4. Ramenskaya G. V., Shohin I. E., Savchenko A. Y., Volkova E. A. The dissolution test in biorelevant media as a prognostic tool for modeling of drug behavior *in vivo*. *Biomedicine*. 2011;57(5):482–489. (In Russ.) DOI: 10.18097/PBMC20115705482.
5. Ali J., Lee J. B., Gittings S., Iachelini A., Bennett J., Cram A., Garnett M., Roberts C. J., Gershtovich P. Development and optimisation of simulated salivary fluid for biorelevant oral cavity dissolution. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2021;160:125–133. DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.01.017.
6. Viktorova A. S., Elizanova E. S., Romanova R. S., Timergaliev V. R., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Interpolymer Complexes Based on Carbopol® and Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as Carriers for Buccal Delivery of Metformin. *Drug development & registration*. 2021;10(1):48–55. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-48-55
7. Likhovad E. V., Shakovets N. V. Saliva: the significance for the organs and tissues in the oral cavity in health and disease. *Meditinskii zhurnal*. 2013;3:7–11. (In Russ.)
8. Nadia F. H., Ismail A. Effect of 10 Gram Cheddar Cheese Consumption on Salivary pH – A Study of Dentistry Students of Sultan Agung Islamic University Semarang. *Odonto: Dental Jurnal*. 2014;1(1):34–38.
9. Oktanuli P., Zikir A. P., Taher P., Herawati M., Sean M. Effect of Robusta Coffee (*Coffea Canephora*) on the Degree of Acidity (pH) of Saliva. *International Journal of Clinical Science and Medical Research*. 2023;3(5):97–101. DOI: 10.55677/IJCSMR/V3I5-02/2023.
10. Marques M. R. C., Loebeberg R., Almukainzi M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technologies*. 2011;18(3):15–28. DOI: 10.14227/DT180311P15.
11. Wang Q., Gao C., Yang N., Nishinari K. Effect of simulated saliva components on the *in vitro* digestion of peanut oil body emulsion. *RSC Advances*. 2021;11(49):30520–30531. DOI: 10.1039/d1ra03274g.
12. Sarkisyan N. G., Kataeva N. N., Khokhryakova D. A., Melikyan S. G. Assessment of the relationship between the physicochemical parameters of saliva, the type of nutrition, and the quality of drinking water. *Vrach*. 2022;33(7):68–71. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877305-2022-07-14.
13. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive Interpolyelectrolyte Complexes for the Buccal Delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018;10(1):85. DOI: 10.3390/polym10010085.
14. Kharenko E. A., Larionova N. I., Demina N. B. Mucoadhesive drug delivery systems (a review). *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2009;43(4):21–29. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-4-21-29.
15. Isaeva N. V., Tulaykin A. I., Sheshegova E. V. Tablets. Regulatory requirements of the state pharmacopoeia XIII edition. *Drug development & registration*. 2017;3(3):178–183. (In Russ.)
16. Opryshko V. I. Nosivets D. S. Innovations that change stereotypes of future pharmacology. *Meditinskii aspekty zdorovia zhenshchiny*. 2016;2(98):43–47. (In Russ.)
17. Poluyanov A. M., Kochug A., Mitrofanova L. S., Nikitin I. D., Vergasov O. Yu., Shohin I. E., Fisher E. N. Development, Validation and Approbation Analytical Method for the Quantitative Determination of Taurine by HPLC-UV Method in the Test of Comparative Dissolution Kinetics. *Drug development & registration*. 2023;12(2):62–72. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-62-72.
18. Kalmykov P. A., Kustova T. P., Kustov S. O., Shestakovskaya P. S., Azmetov T. R., Kalmykova A. A. One-pot determination of amino acids in drugs by pre-column derivatization with phenyl isothiocyanate. *Fine Chemical Technologies*. 2024;19(2):127–138. (In Russ.) DOI: 10.32362/2410-6593-2024-19-2-127-138.
19. Askretkov A. D., Klislin A. A., Zybin D. I., Orlova N. V., Kholodova A. V., Lobanova N. V., Seregin Yu. A. Determination of twenty proteinogenic amino acids and additives in cultural liquid by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*. 2020;75(8):721–729. DOI: 10.31857/S0044450220080034.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.074

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1890>



Проведение физиологически релевантного теста для таблеток кладрибина

П. А. Лосенкова^{1, 2✉}, Д. Д. Гвоздев^{1, 2}, А. В. Суворова², Ю. В. Медведев^{1, 2}, В. С. Щербакова⁴, Ю. Г. Казаишвили⁴, К. Я. Заславская⁵, А. М. Полуянов^{1, 2}, И. Е. Шохин³

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс». 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8., помещ. 1/2

³ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

⁴ Общество с ограниченной ответственностью «ПРОМОМЕД РУС». 129090, Россия, г. Москва, проспект Мира, д. 13, стр. 1, офис 13

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва». 430005, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68

✉ Контактное лицо: Лосенкова Полина Антоновна. E-mail: info@scientific-compliance.ru

ORCID: П. А. Лосенкова – <https://orcid.org/0009-0005-2391-5267>;

Д. Д. Гвоздев – <https://orcid.org/0009-0003-6024-6678>;

А. В. Суворова – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;

Ю. В. Медведев – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>;

В. С. Щербакова – <https://orcid.org/0000-0002-7251-8744>;

Ю. Г. Казаишвили – <https://orcid.org/0000-0003-0826-4177>;

К. Я. Заславская – <https://orcid.org/0000-0002-7348-9412>;

А. М. Полуянов – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>;

И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 08.07.2024

Статья принята в печать: 14.08.2024

Статья опубликована: 14.08.2024

Резюме

Введение. Внедрение аппаратов – аналогов GIS (далее – Gastro-intestinal simulator) является одним из актуальных путей развития *in-vitro*-оценки качества твердых лекарственных форм. Испытания на приборе для физиологически релевантных тестов (далее – ФРТ) позволяют предсказать фармакокинетические профили за счет более релевантных условий, среди которых использование биорелевантных сред растворения, физиологичные объемы отделов ЖКТ, а также транзит между ними.

Цель. Провести исследование таблеток кладрибина на физиологически релевантном тестере с целью предсказания поведения препарата в ЖКТ человека.

Материалы и методы. Объектами исследования являются «Мавенклад[®], таблетки, 10 мг» (серия 2200754, срок годности до 04.2025, NERPHARMA, S.r.L., Италия) и «Кладрибин, таблетки, 10 мг» отечественного производства с действующим сроком годности. Во время исследования использовались реактивы, необходимые для приготовления биорелевантных сред растворения и проведения количественного определения методом ВЭЖХ. Физиологически релевантный тест проводили на аппарате собственного производства, состоящем из тестера растворения DT-6 (ERWEKA GmbH, Германия), водяной бани, оснащенной нагревательным элементом Thermomix WB-4 (B. Braun, Германия), насосов перистальтических (Катюг, Китай). Количественное содержание высвободившегося кладрибина оценивали на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия) по валидированной методике при длине волны 252 нм, время анализа – 7 мин, колонка – Grace HPLC Column Platinum C18-EPS, 250 × 4.6 мм, 5 мкм (Grace, США), температура – 35 °С, режим элюирования – изократический (А:В 80:20), подвижная фаза А – 0,1%-й раствор H₃PO₄, фаза В – ацетонитрил.

Результаты и обсуждение. Были получены профили, позволяющие оценить динамику и степень высвобождения исследуемых ЛС в различных отделах ЖКТ человека. Несмотря на ожидаемую деградацию кладрибина в кислой среде (рН 1,2), в физиологически релевантных условиях препарат достиг третьего отдела (модель тонкого кишечника) без

© Лосенкова П. А., Гвоздев Д. Д., Суворова А. В., Медведев Ю. В., Щербакова В. С., Казаишвили Ю. Г., Заславская К. Я., Полуянов А. М., Шохин И. Е., 2024

© Losenkova P. A., Gvozdev D. D., Suvorova A. V., Medvedev Yu. V., Shcherbakova V. S., Kazaishvili Yu. G., Zaslavskaya K. Ya, Poluyanov A. M., Shohin I. E., 2024

деградации. Наблюдалось полное высвобождение кладрибина из лекарственной формы для тестового и референтного лекарственных препаратов. Также в дальнейшем, исходя из полученных данных, можно предсказать фармакокинетические профили при помощи подходов физиологически обоснованного фармакокинетического моделирования.

Заключение. Проведено исследование ФРТ для препаратов «Мавенклад[®], таблетки, 10 мг» и «Кладрибин, таблетки, 10 мг». Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ-УФ. По результатам испытания было отмечено полное высвобождение обоих препаратов и достижение отдела, имитирующего кишечник, что указывает на отсутствие деградации кладрибина в отделе, имитирующем желудок.

Ключевые слова: кладрибин, физиологически релевантный тест, биорелевантные среды, ВЭЖХ-УФ, FaSSIF, FaSSGF

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

Вклад авторов. А. М. Полуянов и И. Е. Шохин придумали и разработали эксперимент. П. А. Лосенкова, Д. Д. Гвоздев, А. В. Суворова провели физиологически релевантный тест. П. А. Лосенкова проводила количественную оценку высвобождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. П. А. Лосенкова и Ю. В. Медведев участвовали в обработке данных. Ю. Г. Казаишвили, К. Я. Заславская, В. С. Щербакова, П. А. Лосенкова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование проведено в рамках коммерческой работы ООО «ПРОМОМЕД РУС».

Для цитирования: Лосенкова П. А., Гвоздев Д. Д., Суворова А. В., Медведев Ю. В., Щербакова В. С., Казаишвили Ю. Г., Заславская К. Я., Полуянов А. М., Шохин И. Е. Проведение физиологически релевантного теста для таблеток кладрибина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):156–164. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1890>

Performing a physiologically relevant test for cladribine tablets

Polina A. Losenkova^{1,2}✉, Danila D. Gvozdev^{1,2}, Alexandra V. Suvorova²,
Yuri V. Medvedev^{1,2}, Victoria S. Shcherbakova⁴, Yuri G. Kazaishvili⁴,
Kira Ya. Zaslavskaya, Andrey M. Poluyanov^{1,2}, Igor E. Shohin³

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

² Limited Liability Company "Scientific Compliance". 1/2, 8, Simferopolsky bulvar, Moscow, 117246, Russia

³ Limited Liability Company "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopolsky bulvar, Moscow, 117246, Russia

⁴ Limited Liability Company "PROMOMED RUS". Office 13, 13/11, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russia

⁵ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "National Research Ogarev Mordovia State University". 68, Bolshevistskaya str., Saransk, Republic of Mordovia, 430005, Russia

✉ **Corresponding author:** Polina A. Losenkova. **E-mail:** info@scientific-compliance.ru

ORCID: Polina A. Losenkova – <https://orcid.org/0009-0005-2391-5267>;

Danila D. Gvozdev – <https://orcid.org/0009-0003-6024-6678>;

Alexandra V. Suvorova – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;

Yuri V. Medvedev – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>;

Victoria S. Shcherbakova – <https://orcid.org/0000-0002-7251-8744>;

Yuri G. Kazaishvili – <https://orcid.org/0000-0003-0826-4177>;

Kira Ya. Zaslavskaya – <https://orcid.org/0000-0002-7348-9412>;

Andrey M. Poluyanov – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>;

Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 08.07.2024

Accepted: 14.08.2024

Published: 14.08.2024

Abstract

Introduction. The introduction of devices – analogues of GIS (hereinafter-- Gastro-intestinal simulator) is one of the current ways to develop in-vitro assessment of the quality of solid dosage forms. Testing on a physiologically relevant test device (hereinafter referred to as PRT) makes it possible to predict pharmacokinetic profiles due to more relevant conditions, including the use of biorelevant dissolution media, physiological volumes of the gastrointestinal tract, as well as transit between them.

Aim. Conduct a study of cladribine tablets on a physiologically relevant tester in order to predict the behavior of the drug in the human gastrointestinal tract.

Materials and methods. The objects of the study are "Mavenclad[®], tablets, 10 mg" (series 2200754, expiration date until 04.2025, NERPHARMA, S.r.L., Italy) and "Cladribine, tablets, 10 mg" of domestic production with valid expiration date. During the study, the reagents necessary for the preparation of biorelevant dissolution media and quantitative determination by HPLC. Physiologically relevant test were carried out using an apparatus of our own production, consisting of a DT-6 dissolution tester (ERWEKA GmbH, Germany), a water bath equipped with a Thermomix WB-4 heating element (B. Braun, Germany), and peristaltic pumps (Kamoer, China). The quantitative content of released cladribine was assessed using a highly efficient liquid chromatograph "Khromatek-Kristall HPLC 2014" (ZAO SKB "Khromatek", Russia) using a validated method at a wavelength

of 252 nm, analysis time – 7 min, column – Grace HPLC Column Platinum C18-EPS, 250 × 4.6 mm, 5 mm (Grace, USA), temperature – 35 °C, elution mode – isocratic (A : B 80 : 20), mobile phase A – 0.1 % H₃PO₄ solution, phase B – acetonitrile.

Results and discussion. Profiles were obtained to assess the dynamics and degree of release of the studied drugs in various parts of the human gastrointestinal tract. Despite the expected degradation of cladribine in an acidic environment (pH1.2), under physiologically relevant conditions, the drug reached the third section (small intestine model) without degradation. Complete release of cladribine from the test and reference dosage forms was observed. Also, in the future, based on the data obtained, it is possible to predict pharmacokinetic profiles using physiologically based pharmacokinetic modeling approaches.

Conclusion. A PSF study was conducted for the drugs "Mavenclad®, tablets, 10 mg" and "Cladribine, tablets, 10 mg". Quantitative determination was carried out by HPLC-UV method. The test results showed complete release of both drugs and reaching the intestinal tract, indicating the absence of degradation of cladribine in the region simulating the stomach.

Keywords: cladribine, physiologically relevant test, biorelevant media, HPLC-UV, FaSSIF, FaSSGF

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. Andrey M. Poluyanov and Igor E. Shokhin invented and developed the experiment. Polina A. Losenkova, Danila D. Gvozdev, Alexandra V. Suvorova conducted a physiologically relevant test. Polina A. Losenkova quantitatively assessed the release using high-performance liquid chromatography. Polina A. Losenkova and Yuri V. Medvedev participated in data processing. Yuri G. Kazaishvili, Kira Ya. Zaslavskaya, Victoria S. Shcherbakova, Polina A. Losenkova. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The study was conducted as part of the commercial work of LLC "PROMOMED RUS".

For citation: Losenkova P. A., Gvozdev D. D., Suvorova A. V., Medvedev Yu. V., Shcherbakova V. S., Kazaishvili Yu. G., Zaslavskaya K. Ya, Poluyanov A. M., Shohin I. E. Performing a physiologically relevant test for cladribine tablets. *Drug development & registration*. 2024;13(3):156–164. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1890>

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение аппаратов – аналогов GIS является одним из актуальных путей развития современных *in-vitro*-исследований твердых лекарственных форм [1]. Проведение физиологически релевантного теста позволяет с высоким уровнем дискриминаторности проводить оценку степени высвобождения лекарственных препаратов. Преимуществом данного метода является использование биорелевантных сред растворения, имитирующих состав различных отделов желудочно-кишечного тракта. Такими средами являются Fasted State Simulated Intestinal Fluid (далее – FaSSIF) и Fasted State Simulated Gastric Fluid (далее – FaSSGF) [2, 3].

Данное испытание важно проводить при фармацевтической разработке новых лекарственных препаратов, особенно при последующем проведении биовейвера, который возможен для препаратов I и III классов БКС (биофармацевтическая классификационная система).

Одним из лекарственных препаратов, для которого возможно проведение процедуры, является кладрибин, относящийся к III классу БКС. Отдельно хочется отметить, что для данной молекулы оправданно проведение ФРТ из-за большого значения

pH отдела, имитирующего желудок (pH 2,84), так как, согласно литературным данным, в кислой среде кладрибин разрушается с образованием 2-хлоро-6-аминопурина (схема гидролиза приведена на рисунке 1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования являлись: «Мавенклад®, таблетки, 10 мг» (серия 2200754, срок годности до 04.2025, NERPHARMA, S.r.L., Италия) и «Кладрибин, таблетки, 10 мг» отечественного производства с действующим сроком годности.

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: вода очищенная, тип I; хлористоводородная кислота (HCl) концентрированная (класс «х.ч.», ООО «Сигма Тек», Россия); ортофосфорная кислота (H₃PO₄) концентрированная (класс «for HPLC», Scharlau, Испания); натрия гидроксид (NaOH) (класс «ч.д.а.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрий фосфорнокислый 2-зам. (Na₂HPO₄), безводный (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив»,

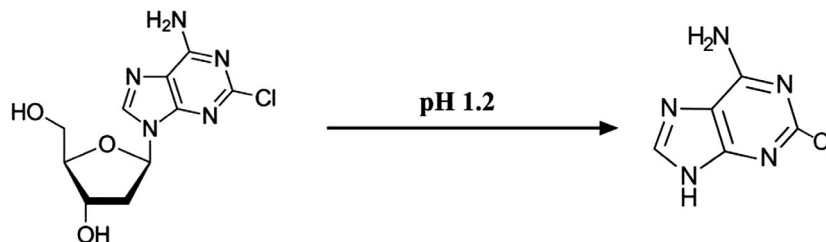


Рисунок 1. Схема гидролиза вещества кладрибин

Figure 1. Scheme of hydrolysis of the substance cladribine

Россия); натрия хлорид (NaCl) (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); 3F Powder (Biorelevant, Великобритания); ацетонитрил (ACN) (класс «HPLC gradient grade», Biosolve, Франция).

Физиологически релевантный тест проводили на аппарате собственного производства, состоящем из тестера растворения DT-6 (ERWEKA GmbH, Германия), водяной бани, оснащенной нагревательным элементом Thermomix WB-4 (B. Braun, Германия), насосов перистальтических (Катюер, Китай). Хроматографическое разделение и оценку количественного содержания кладрибина проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия) при длине волны 252 нм. Время хроматографирования составило 7 мин. Использовали колонку Grace HPLC Column Platinum C18-EPS, 250 × 4,6 мм, 5 мм (Grace, США), помещенную в колоночный термостат, поддерживающий температуру 35 °C на протяжении всего аналитического цикла. Режим элюирования – изократический (А:В 80:20), в качестве подвижной фазы А выступал 0,1%-й раствор H_3PO_4 , фазы В – ацетонитрил. Перед анализом методика была валидирована по параметрам: «специфичность», «градуировочная кривая (линейность)», «правильность и повторяемость», «правильность и прецизионность в разные дни», «стабильность». Аналитический диапазон методики составил от 0,0025 мг/мл до 2,0000 мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе выполнения исследования были проанализированы образцы, полученные в ходе проведения ФРТ для препаратов кладрибина, количественное определение проводилось методом ВЭЖХ.

Методология проведения испытания ФРТ

При проведении эксперимента оценивалось высвобождение лекарственного препарата с учетом физиологического транзита в ЖКТ человека. Схема аппарата для испытаний представлена на рисунке 2.

Для первого отдела был использован раствор биорелевантной среды растворения FaSSGF, который имитирует состав желудочного сока натощак

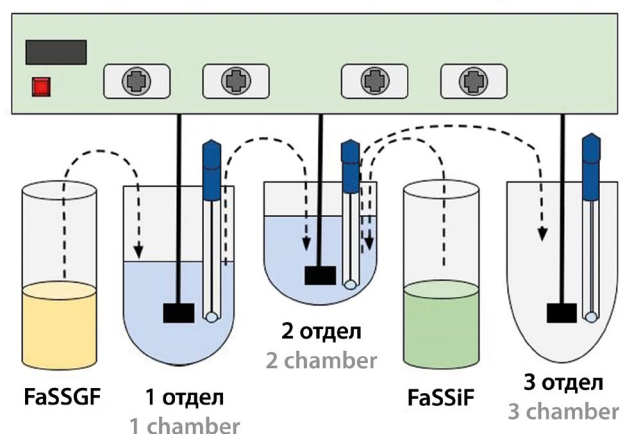


Рисунок 2. Схема аппарата

Figure 2. Scheme of apparatus

со значением pH 2,0. К 50 мл раствора добавлялось 250 мл воды очищенной (стакан воды, которым запивают таблетку), общий стартовый объем составлял 300 мл, а значение pH данного раствора – 2,84, что соответствует литературным данным о значении pH желудка у здоровых людей [4–6]. Отдел, имитирующий желудок, опорожнялся по уравнению кинетики первого порядка, период полупорожнения составил 18 минут, а время полного опорожнения (до объема 50 мл) составило 38,6 минут [7]. Стоит отметить, что скорость опорожнения желудка влияет на время достижения пероральной лекарственной формой тонкого кишечника, что, в свою очередь, лимитирует абсорбцию действующего вещества энтероцитами кишечника.

Для имитации физиологических условий 12-перстной кишки была выбрана биорелевантная среда растворения FaSSiF со значением pH 6,5, стартовый объем в течение всего теста был постоянен и составлял 75 мл, что является физиологическим объемом для 12-перстной кишки [7, 8].

Третий отдел, моделирующий кишечник, служит в качестве приемника содержимого второго отдела, поэтому стартовый объем был равен нулю, но к концу теста доходил до 390 мл.

В ходе теста осуществлялась постоянная секрeция в первый и во второй отделы сред FaSSGF и FaSSIF соответственно со скоростью 1 мл/мин. На рисунке 3 приведена диаграмма фактического количества среды в разных отделах аппарата для различных временных точек.

В каждом из отделов был размещен электрод pH-метра для регистрации значения pH в каждой временной точке отбора (рисунок 4).

Перемешивание осуществлялось при помощи разработанных лопастей, тип аппарата – II «Лопастная мешалка», оснащенная двумя круглыми отверстиями (рисунок 5). Скорость вращения лопастной мешалки составляла 25 об/мин, также был активен режим ускорения вращения «burst», моделирующий реальную моторику ЖКТ, в ходе которого каждые 5 мин осуществлялось ускорение лопастей до скорости 180 об/мин, продолжавшееся в течение 15 с, после чего условия возвращались к первоначальным [7, 8].

Выбор временных точек отбора проб – 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 и 80 мин – был произведен таким об-

разом, чтобы полностью описать профиль растворения исследуемых лекарственных препаратов в каждом из отделов с учетом времени транзита по ЖКТ человека.

Количественное определение проводили по разработанной и валидированной методике ВЭЖХ-УФ. Во всех изученных образцах наблюдался единственный пик со временем удерживания около 4,25 мин, пример хроматограммы приведен на рисунке 6. В каждом образце оценивалась концентрация, которая затем использовалась для построения профилей высвобождения (представлены на рисунках 7 и 8).

Стоит отметить, что в рамках предварительных испытаний таблеток кладрибина было выявлено, что он деградирует в фармакопейной среде со значением pH 1,2. Но в рамках проведения ФРТ использовался раствор среды со значением pH 2,84, имитирующий желудок натощак после записывания водой, что более приближено к условиям организма человека. При этом время нахождения препаратов в камере желудка составляло 40 мин с периодом по-

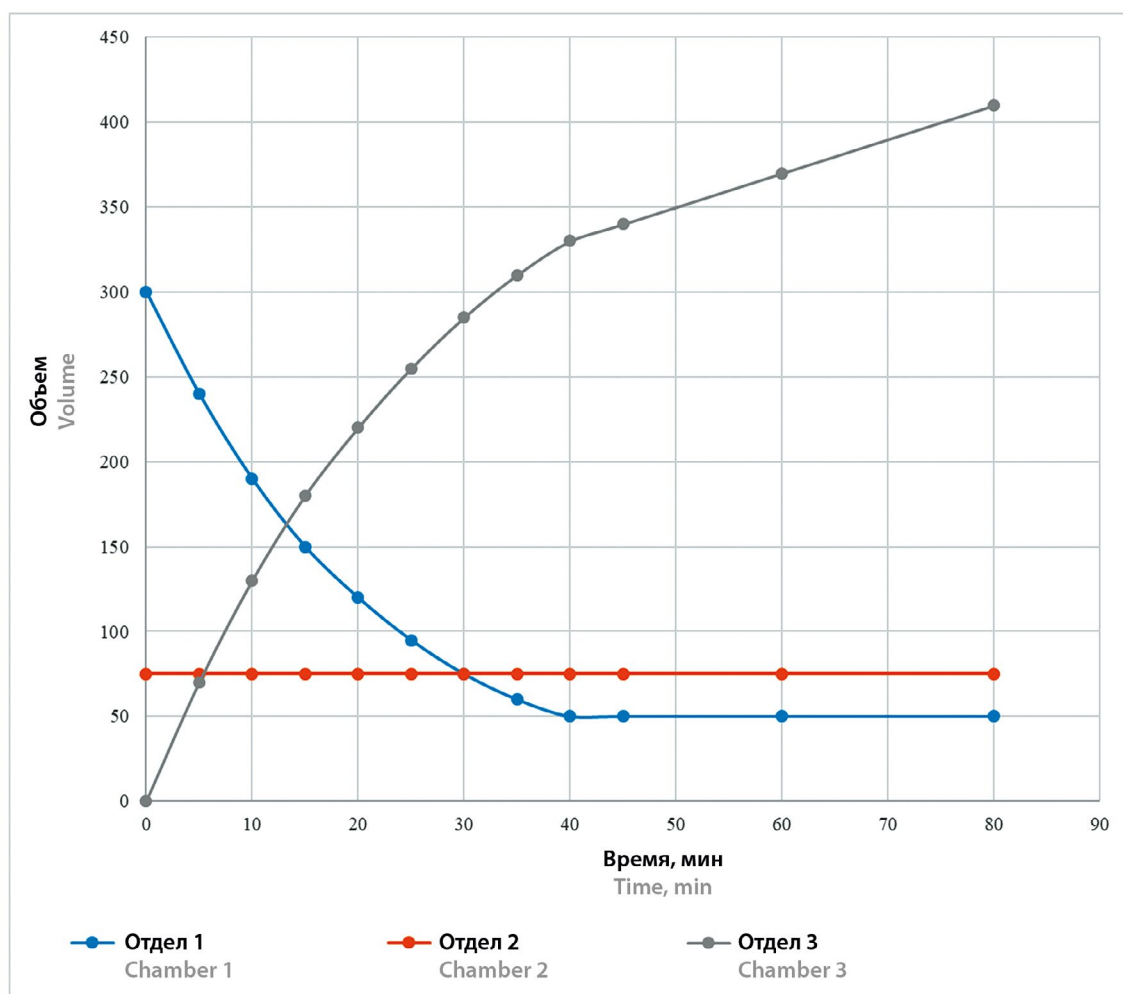


Рисунок 3. Диаграмма объемов

Figure 3. Diagram of volumes

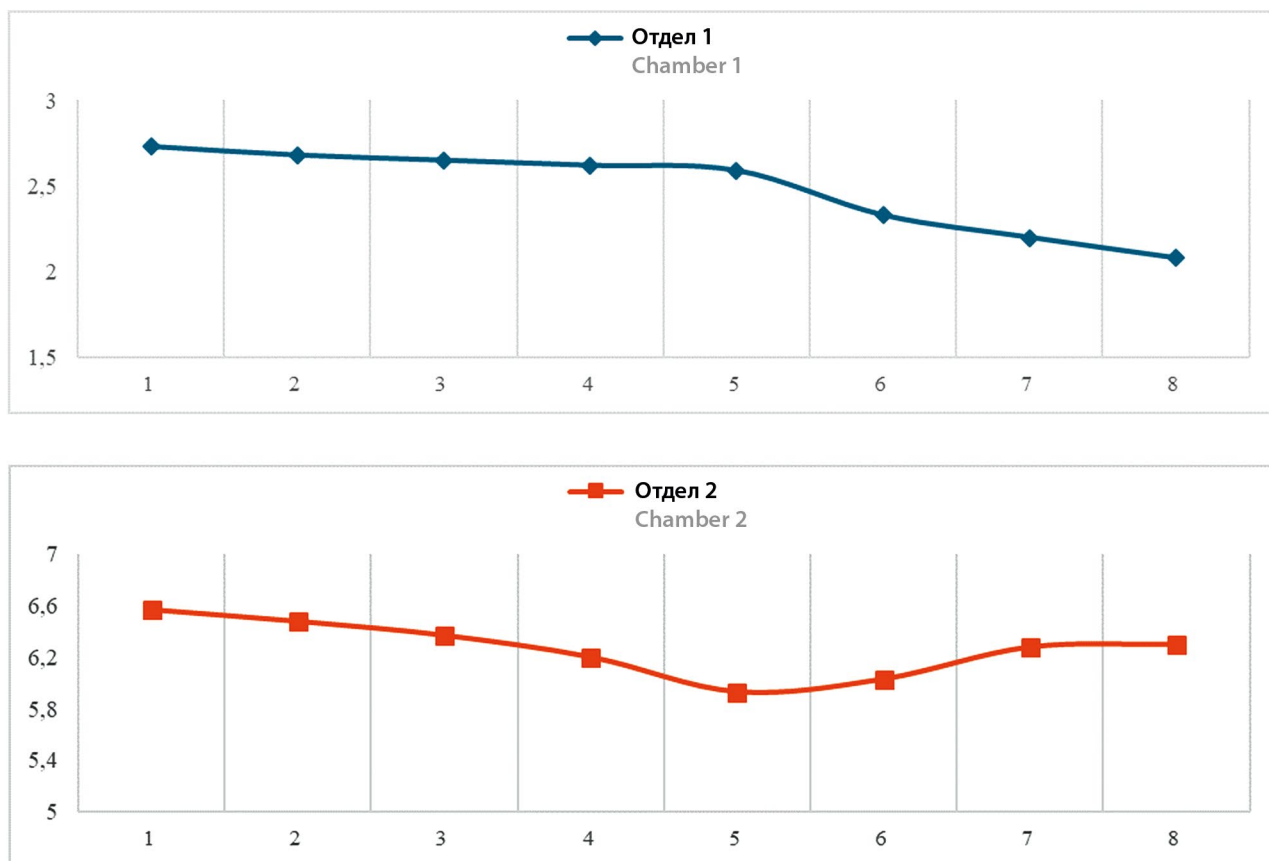


Рисунок 4. Значение pH в каждом из отделов

Figure 4. The pH value in each of the chambers

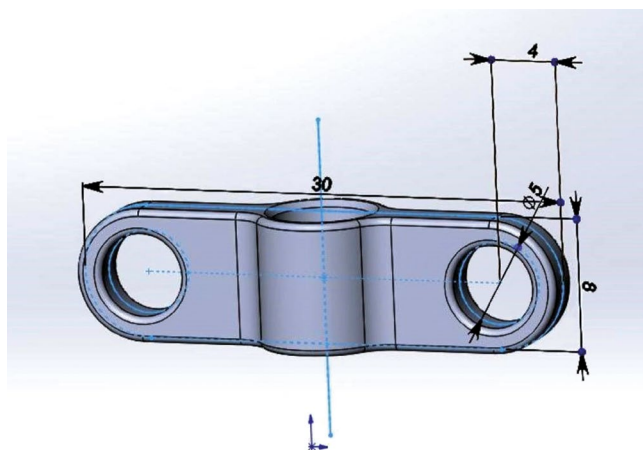


Рисунок 5. Форма лопастной мешалки ФРТ

Figure 5. Shape of the PRT paddle

луопорожнения 18 мин, и в данных условиях было отмечено, что вещество не подвергалось разрушению и переходило в третий отдел аппарата в неизменном виде.

Поскольку при исследовании методом ФРТ неприемлемы классические методы оценки эквивалентно-

сти профилей (например, f2 в связи с параболической формой профиля), сопоставимость тестового и референтного препаратов была доказана и оценивалась по скорости перехода вещества и полноте высвобождения в третьем отделе, который имитирует кишечник, где происходит абсорбция вещества. По полученным данным можно предсказать фармакокинетические профили при помощи подходов физиологически обоснованного фармакокинетического моделирования и таких программ, как PK Quest, Gastro Plus, PK-sim и SimCyp.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование ФРТ для препаратов «Мавенклад», таблетки, 10 мг и «Кладрибин, таблетки, 10 мг». Количественное определение осуществлялось валидированным методом ВЭЖХ-УФ. По результатам испытания было отмечено достижение третьего отдела и полное высвобождение кладрибина из лекарственной формы для тестового и референтного лекарственных препаратов в физиологически релевантных условиях, что позволяет судить о их сопоставимости в физиологически релевантных условиях.

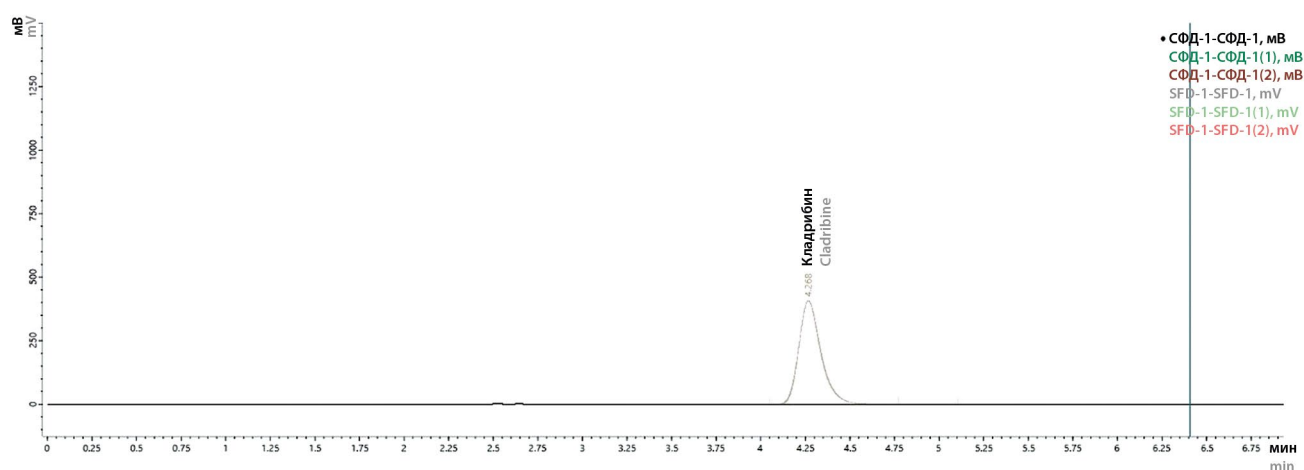


Рисунок 6. Образец хроматограммы

Figure 6. Sample of chromatogram

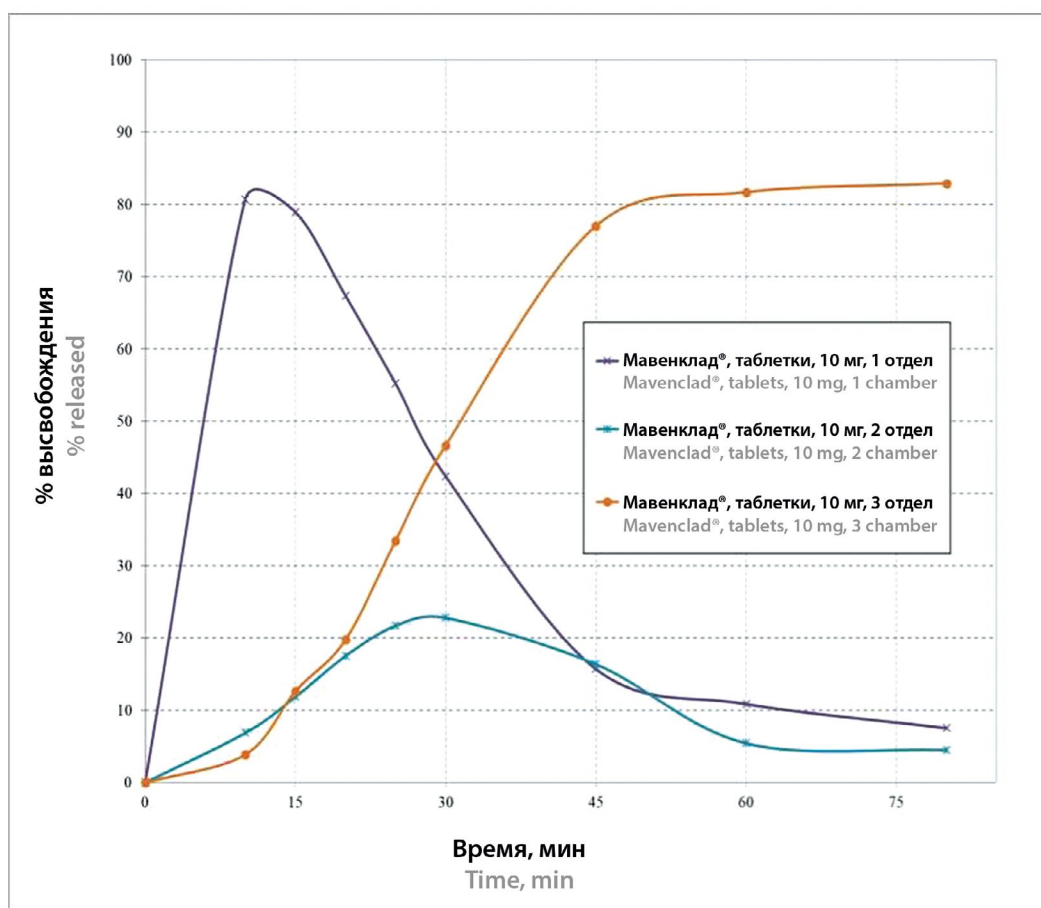


Рисунок 7. Усредненные профили растворения кладрибина в лекарственном средстве «Мавенклад», таблетки, 10 мг» в трех отделах аппарата

Figure 7. Averaged profiles of the dissolution of cladribine in the drug "Mavenclad®, tablets, 10 mg" in three chambers of the apparatus

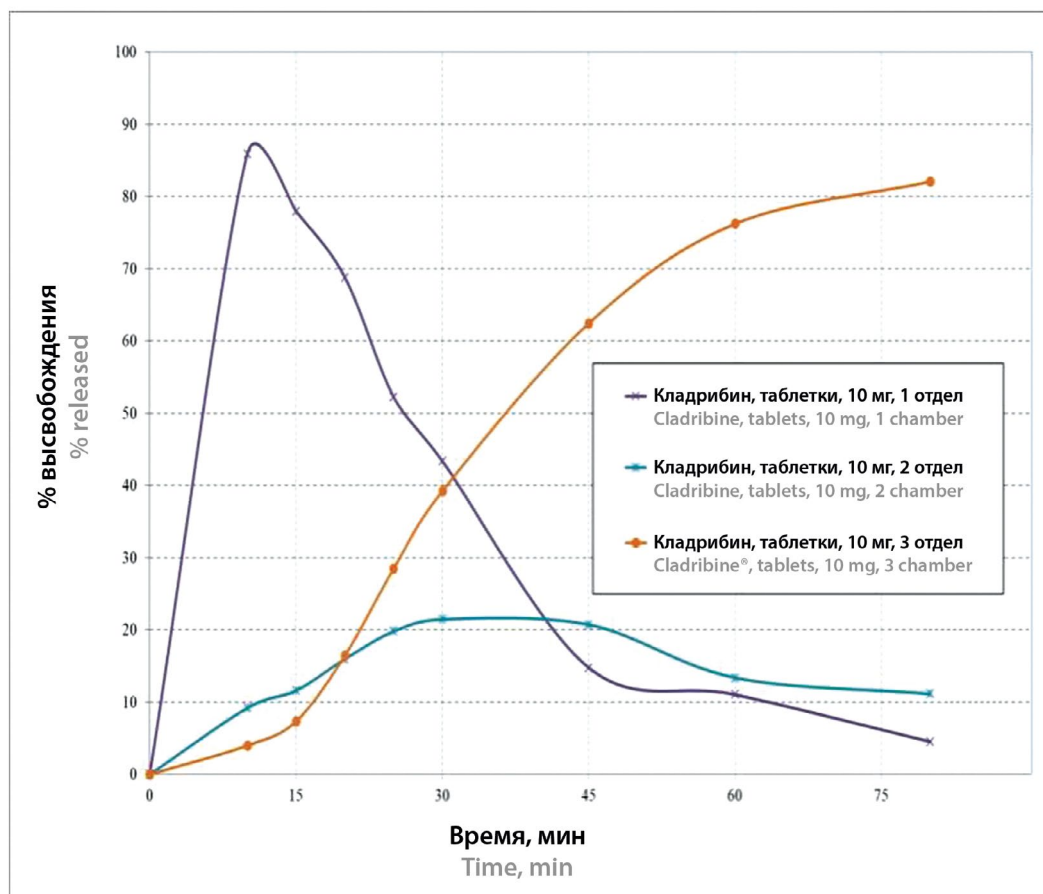


Рисунок 8. Усредненные профили растворения кладрибина в лекарственном средстве «Кладрибин, таблетки, 10 мг» в трех отделах аппарата

Figure 8. Averaged profiles of the dissolution of cladribine in the drug "Cladribine, tablets, 10 mg" in Three chambers of the apparatus

ЛИТЕРАТУРА

- Bermejo M., Kuminek G., Al-Gousous J., Ruiz-Picazo A., Tsume Y., Garcia-Arieta A., González-Alvarez I., Hens B., Mudie D., Amidon G.E., Rodriguez-Hornedo N., Amidon G.L. Exploring Bioequivalence of Dexketoprofen Trometamol Drug Products with the Gastrointestinal Simulator (GIS) and Precipitation Pathways Analyses. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):122. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030122.
- De Lemos H., Deris Prado L., Antunes Rocha H.V. Use of biorelevant dissolution media in dissolution tests as a predictive method of oral bioavailability. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;58:e19759. DOI: 10.1590/s2175-97902022e19759.
- Волкова Е. А., Шохин И. Е., Раменская Г. В., Савченко А. Ю. Биорелевантные среды растворения – современный инструмент для моделирования процессов растворения и всасывания. *Биомедицина*. 2011;3:133–140.
- Ковешников А. И., Крылов И. В. Изменения pH после еды в различных отделах желудка у пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. *The scientific heritage*. 2019;42:59–64.
- Камалтдинов М. Р., Трусов П. В., Зайцева Н. В. Течение многокомпонентной смеси в желудке и двенадцатиперстной кишке с учетом функциональных нарушений: результаты численного моделирования для определения кислотности. *Российский журнал биомеханики*. 2017;21(3):239–260.
- Koziolek M., Grimm M., Becker D., Iordanov V., Zou H., Shimizu J., Wanke C., Garbacz G., Weitschies W. Investigation of pH and Temperature Profiles in the GI Tract of Fasted Human Subjects Using the Intellicap® System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(9):2855–2863. DOI: 10.1002/jps.24274.
- Kerlin P., Zinsmeister A., Phillips S. Relationship of motility to flow of contents in the human small intestine. *Gastroenterology*. 1982;82(4):701–706. DOI: 10.1016/0016-5085(82)90314-6.
- Honigford C.R., Aburub A., Fadda H.M. A Simulated Stomach Duodenum Model Predicting the Effect of Fluid Volume and Prandial Gastric Flow Patterns on Nifedipine Pharmacokinetics From Cosolvent-Based Capsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;108(1):288–294. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.07.023.

9. Hermann R., Karlsson M.O., Novakovic A.M., Terranova N., Fluck M., Munafo A. The Clinical Pharmacology of Cladribine Tablets for the Treatment of Relapsing Multiple Sclerosis. *Clinical Pharmacokinetics*. 2019;58:283–297. DOI: 10.1007/s40262-018-0695-9.
10. Дружининская О.В., Смахова И.Е. Среды растворения, применяемые в разработке и контроле качества лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):144–150.
11. Sun L., Sun J., He Z. Exploring the Feasibility of Biowaiver Extension of BCS Class III Drugs with Site-Specific Absorption Using Gastrointestinal Simulation Technology. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2017;42(3):471–487. DOI: 10.1007/s13318-016-0361-2.
12. Tsume Y., Amidon G.L. The biowaiver extension for BCS class III drugs: the effect of dissolution rate on the bioequivalence of BCS class III immediate-release drugs predicted by computer simulation. *Molecular Pharmaceutics*. 2010;7(4):1235–1243. DOI: 10.1021/mp100053q.
9. Hermann R., Karlsson M.O., Novakovic A.M., Terranova N., Fluck M., Munafo A. The Clinical Pharmacology of Cladribine Tablets for the Treatment of Relapsing Multiple Sclerosis. *Clinical Pharmacokinetics*. 2019;58:283–297. DOI: 10.1007/s40262-018-0695-9.
10. Druzhinskaya O.V., Smekhova I.E. Dissolution media used in development and quality control of drugs. *Drug development & registration*. 2017;(3):144–150. (In Russ.)
11. Sun L., Sun J., He Z. Exploring the Feasibility of Biowaiver Extension of BCS Class III Drugs with Site-Specific Absorption Using Gastrointestinal Simulation Technology. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2017;42(3):471–487. DOI: 10.1007/s13318-016-0361-2.
12. Tsume Y., Amidon G.L. The biowaiver extension for BCS class III drugs: the effect of dissolution rate on the bioequivalence of BCS class III immediate-release drugs predicted by computer simulation. *Molecular Pharmaceutics*. 2010;7(4):1235–1243. DOI: 10.1021/mp100053q.

REFERENCES

1. Bermejo M., Kuminek G., Al-Gousous J., Ruiz-Picazo A., Tsume Y., Garcia-Arieta A., González-Alvarez I., Hens B., Mudie D., Amidon G.E., Rodriguez-Hornedo N., Amidon G.L. Exploring Bioequivalence of Dexketoprofen Trometamol Drug Products with the Gastrointestinal Simulator (GIS) and Precipitation Pathways Analyses. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):122. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030122.
2. De Lemos H., Deris Prado L., Antunes Rocha H.V. Use of biorelevant dissolution media in dissolution tests as a predictive method of oral bioavailability. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;58:e19759. DOI: 10.1590/s2175-97902022e19759.
3. Volkova E.A., Shokhin I.E., Ramenskaya G.V., Savchenko A.Yu. Biorelevant dissolution media – modern tool for modeling of drugs dissolution and absorption. *Journal Biomed*. 2011;3:133–140.
4. Koveshnikov A.I., Krylov I.V. pH various in different parts of the stomach in patients with duodenal ulcer. *The scientific heritage*. 2019;42:59–64. (In Russ.)
5. Kamaltdinov M.R., Trusov P.V., Zaitseva N.V. Flow of a multicomponent mixture in the stomach and duodenum taking into account functional disorders: results of numerical modeling for determining acidity. *Russian Journal of Biomechanics*. 2017;21(3):239–260. (In Russ.)
6. Koziolk M., Grimm M., Becker D., Iordanov V., Zou H., Shimizu J., Wanke C., Garbacz G., Weitschies W. Investigation of pH and Temperature Profiles in the GI Tract of Fasted Human Subjects Using the Intellicap® System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(9):2855–2863. DOI: 10.1002/jps.24274.
7. Kerlin P., Zinsmeister A., Phillips S. Relationship of motility to flow of contents in the human small intestine. *Gastroenterology*. 1982;82(4):701–706. DOI: 10.1016/0016-5085(82)90314-6.
8. Honigford C.R., Aburub A., Fadda H.M. A Simulated Stomach Duodenum Model Predicting the Effect of Fluid Volume and Prandial Gastric Flow Patterns on Nifedipine Pharmacokinetics From Cosolvent-Based Capsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;108(1):288–294. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.07.023.



29–30 октября 2024
Санкт-Петербург

Конференция ДИАЛОГИ О КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ



Партнер:



Поддержка:



САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ
ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ
ПАЛАТА

Организатор:



clinic.restec.ru

+7 965 772 77 91



Применение физиологически релевантного тестера (ФРТ) для предсказания фармакокинетических профилей в рамках исследования биоэквивалентности препарата деферазирокс

А. В. Суворова¹✉, П. А. Лосенкова^{1, 2}, Ю. В. Медведев^{1, 2}, Е. А. Малашенко^{2, 3},
И. Е. Макаренко⁴, А. М. Полуянов^{1, 2}, И. Е. Шохин³

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс». 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8., помещ. 1/2

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

³ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А. И. Евдокимова Минздрава России). 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

✉ Контактное лицо: Суворова Александра Вадимовна. E-mail: info@scientific-compliance.ru

ORCID: А. В. Суворова – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;
П. А. Лосенкова – <https://orcid.org/0009-0005-2391-5267>;
Ю. В. Медведев – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>;
Е. А. Малашенко – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>;
И. Е. Макаренко – <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>;
А. М. Полуянов – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>;
И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 08.07.2024

Статья принята в печать: 26.08.2024

Статья опубликована: 27.08.2024

Резюме

Введение. Деферазирокс является комплексообразующим лекарственным средством и относится ко II классу по биофармацевтической классификационной системе (БКС), обладает кислотными свойствами и относится к подклассу «а» (acid). Данный класс характеризуется высокой проницаемостью и низкой растворимостью, которая лимитирует всасывание действующего вещества в кровь. Вследствие этого разработка препаратов с действующим веществом, которое можно отнести к данному классу БКС, является сложной задачей, а для воспроизведенных препаратов еще и сопряжена с высоким риском получения недоказанной эквивалентности при проведении клинических исследований. Для минимизации вышеописанных рисков был проведен физиологически релевантный тест с дальнейшей обработкой данных и построением предполагаемых фармакокинетических профилей.

Цель. Целью исследования является проведение физиологически релевантного теста (ФРТ) для предсказания по данным *in vitro* фармакокинетических профилей и сопоставление с данными *in vivo* в рамках исследования биоэквивалентности препарата деферазирокс.

Материалы и методы. Объектами исследования являются «Деферазирокс, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 360 мг» отечественного производителя и «Джадену[®], таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 360 мг» (серия WTN22, срок годности до 10.2023, Novartis Pharma Stein AG, Швейцария). Физиологически релевантный тест проводили на приборе СК ФРТ-6 (ООО «Сайнтифик Комплайнс», Россия). Количественный анализ проводили методом ВЭЖХ-УФ. Фармакокинетические профили были смоделированы в программе PK-Sim[®] (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Германия) на основании данных, полученных в рамках проведения физиологически релевантного теста.

Результаты и обсуждение. Был проведен физиологически релевантный тест для лекарственных препаратов деферазирокса, получены профили высвобождения, которые легли в основу физиологически обоснованной фармакокинетической модели совместно с данными о физико-химических свойствах изучаемого соединения и литературными данными о фармакокинетике деферазирокса. Полученные в рамках симуляции на виртуальной популяции фармакокинетические профили были сопоставлены с данными, полученными при проведении клинических испытаний.

Заключение. Проведен физиологически релевантный тест для препарата деферасирукс, количественное определение в образцах проводили методом ВЭЖХ-УФ. В результате проведения теста были получены данные, позволившие спрогнозировать фармакокинетические профили, которые отражают те же различия, что наблюдались в профилях тестового и референтного препарата при проведении исследования сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов деферасирукса.

Ключевые слова: Deferasirox, HPLC, PBPK

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

Вклад авторов. Ю. В. Медведев принимал участие в разработке аналитической методики количественного определения деферасирукса. П. А. Лосенкова отвечала за проведение аналитического этапа исследования. А. В. Суворова и Е. А. Малашенко проводили статистическую обработку данных. А. М. Полуянов отвечал за разработку и научное обоснование эксперимента. И. Е. Шохин и И. Е. Макаренко отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Суворова А. В., Лосенкова П. А., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А., Макаренко И. Е., Полуянов А. М., Шохин И. Е. Применение физиологически релевантного тестера (ФРТ) для предсказания фармакокинетических профилей в рамках исследования биоэквивалентности препарата деферасирукс. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):166–175. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1895>

PRT to predict pharmacokinetic profiles as part of a bioequivalence study of the drug deferasirox

Alexandra V. Suvorova¹✉, Polina A. Losenkova^{1, 2}, Yuri V. Medvedev^{1, 2}, Eugenia A. Malashenko^{2, 3}, Igor E. Makarenko⁴, Andrey M. Poluyanov^{1, 2}, Igor E. Shohin³

¹ Limited Liability Company "Scientific Compliance". 1/2, 8, Simferopolsky bulvar, 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 Limited Liability Company "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopolsky bulvar, Moscow, 117246, Russia

⁴ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 20/1, Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexandra V. Suvorova. **E-mail:** info@scientific-compliance.ru

ORCID: Alexandra V. Suvorova – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;

Polina A. Losenkova – <https://orcid.org/0009-0005-2391-5267>;

Yuri V. Medvedev – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>;

Eugenia A. Malashenko – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>;

Igor E. Makarenko – <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>;

Andrey M. Poluyanov – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>;

Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 08.07.2024

Accepted: 26.08.2024

Published: 27.08.2024

Abstract

Introduction. Deferasirox is a complexing drug and belongs to class II according to the biopharmaceutical classification system (BCS), has acidic properties and belongs to subclass "a" (acid). This class is characterized by high permeability and low solubility, which limits the absorption of the active substance into the blood. As a result, the development of drugs with an active substance that can be assigning BCS to this class is a difficult task, and for generic drugs it is also associated with a high risk of obtaining unproven equivalence during clinical trials. To minimize the above risks, a physiologically relevant test was carried out with further data processing and construction of putative pharmacokinetic profiles.

Aim. The aim of the study is to conduct a physiologically relevant test (PRT) to predict *in vitro* pharmacokinetic profiles and compare them with *in vivo* data as part of a bioequivalence study of deferasirox.

Materials and methods. The objects of the study are "Deferasirox, film-coated tablets, 360 mg" of a domestic manufacturer and "Jadenu®, film-coated tablets, 360 mg" (WTN22 series, expiration date until 10.2023, Novartis Pharma Stein AG, Switzerland). A physiologically relevant test was performed on the device SC PRT-6, Compliance. Quantitative analysis was carried out by HPLC-UV method. Pharmacokinetic profiles were modeled using PK-Sim® (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Germany) based on data obtained from physiologically relevant test.

Results and discussion. A physiologically relevant drug test for deferasirox was performed and release profiles were obtained, which formed the basis of a physiologically based pharmacokinetic model together with data on the physicochemical properties of the studied compound and literature data on the pharmacokinetics of deferasirox. The pharmacokinetic profiles obtained as part of the simulation on a virtual population were compared with data obtained during clinical trials.

Conclusion. A physiologically relevant test for the drug deferasirox was carried out, quantitative determination in the samples was carried out by HPLC-UV. The test resulted in data that allowed prediction of pharmacokinetic profiles that reflected the same differences observed in the profiles of the test and reference drug in the comparative pharmacokinetics and bioequivalence study of deferasirox drugs.

Keywords: Deferasirox, HPLC, PBPK

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. Yuri V. Medvedev took part in the development of an analytical method for the quantitative determination of deferasirox. Polina A. Losenkova was responsible for the analytical stage of the study. Alexandra V. Suvorova and Eugenia A. Malashenko carried out statistical processing of the data. Andrey M. Poluyanov was responsible for the development and scientific substantiation of the experiment. Igor E. Shokhin and Igor E. Makarenko were responsible for the organizational part of the study. All the above authors participated in discussing the results obtained in the form of a scientific discussion.

For citation: Suvorova A. V., Losenkova P. A., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A., Makarenko I. E., Poluyanov A. M., Shohin I. E. PRT to predict pharmacokinetic profiles as part of a bioequivalence study of the drug deferasirox. *Drug development & registration*. 2024;13(3):166–175. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1895>

ВВЕДЕНИЕ

Физиологически обоснованное фармакокинетическое моделирование (Physiologically based pharmacokinetic modelling (PBPK), далее ФОФМ) – это метод математического моделирования, позволяющий описывать фармакокинетику ксенобиотиков на основе их физико-химических свойств и физиологии человека или животных.

Моделирование ФОФМ используется в фармацевтических исследованиях и разработке лекарств, а также при оценке риска для здоровья, связанного с применением тех или иных лекарственных препаратов.

Чаще всего в основе построения физиологически обоснованной фармакокинетической модели лежат отделы, моделирующие различные органы или ткани (например, жировую ткань, мозг, кишечник, сердце, почки, печень, легкие, мышцы, кожу, селезенку и прочее); между отделами транспорт веществ обусловлен потоком различных физиологических жидкостей (артериальная, венозная кровь, желчь и т. д.) и диффузией [1, 2]. Схема модели приведена на рисунке 1.

Каждый такой отдел описывается физиологическими параметрами на основании литературных данных, которые будут характеризовать его как кон-

кретный орган. Взаимодействие между всеми этими отделами описывается с помощью уравнений баланса массы, которые, например, описывают кровоснабжение органов, пассивный транспорт или процесс диффузии через клеточные мембраны во внутриклеточное пространство.

Модели ФОФМ основываются на ряде блоков информации, которые объединяются во время построения модели и могут использоваться для создания различных симуляций. Эти блоки можно разделить на основные группы:

- 1) свойства организма;
- 2) свойства препарата;
- 3) протокол введения и свойства лекарственной формы [3].

В графическом виде блоки информации, необходимые для построения модели PBPK, представлены на рисунке 2.

Опираясь на априорные знания о частично независимых физиологических процессах и информацию о свойствах изучаемого соединения, интегрированных в механистическую структуру, модели ФОФМ позволяют прогнозировать и описывать свойства абсорбции, распределения, метаболизма и выведения

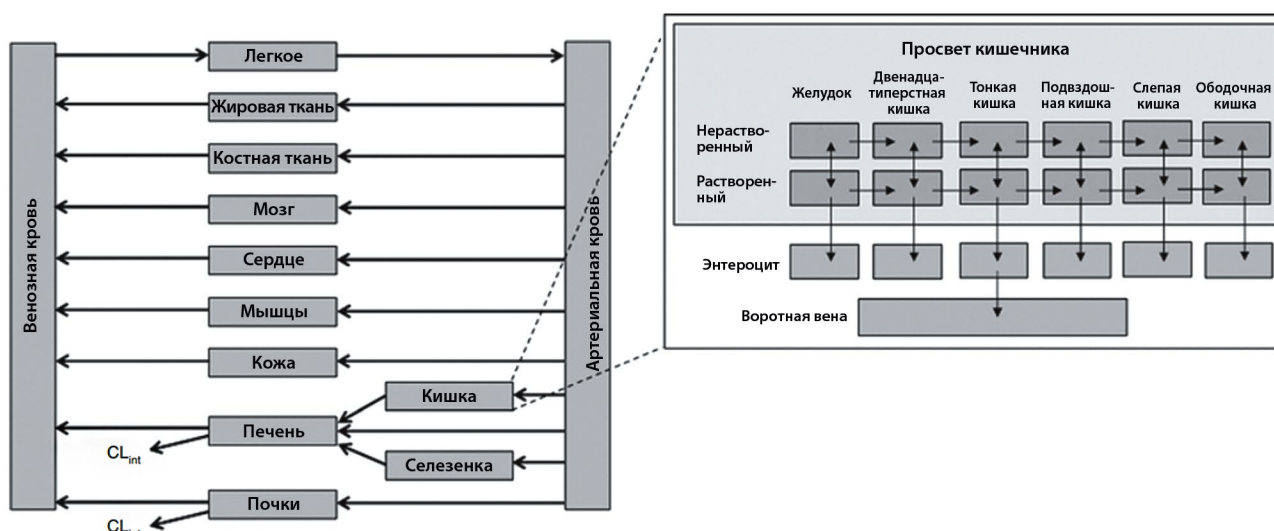


Рисунок 1. Схема физиологически обоснованной фармакокинетической модели

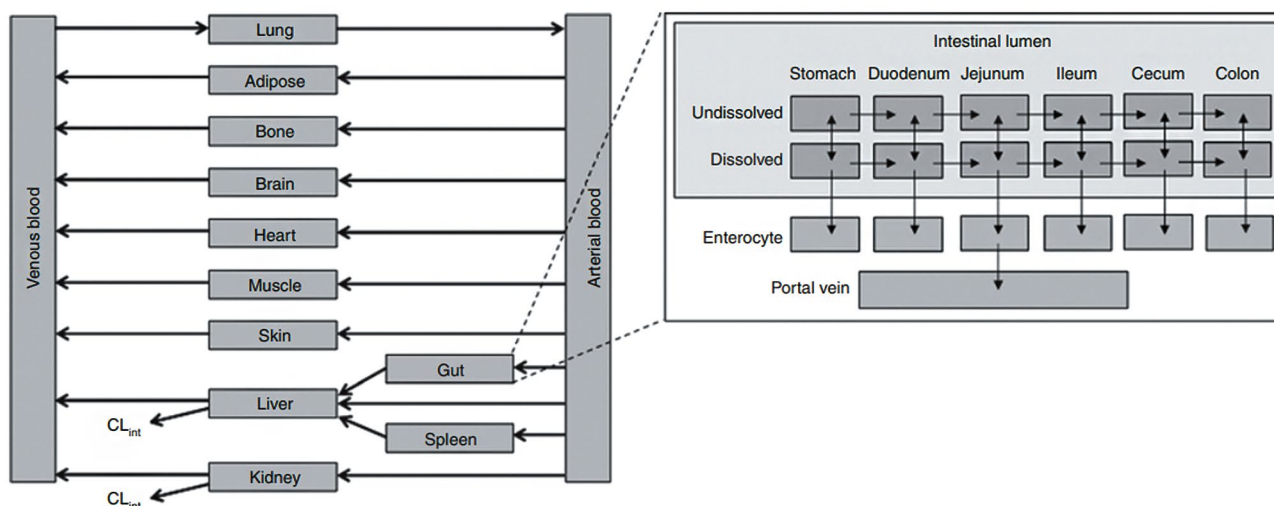


Figure 1. Scheme of a PBPK model

(ADME) препарата, а также описывать его фармакокинетический профиль [4].

Благодаря высокой гибкости и сложности модели ее можно использовать для различных исследований: изучения поведения препаратов в детской популяции [5], исследования фармакокинетических параметров для разных дозировок, исследования поведения препаратов в популяции с определенными заболеваниями [6, 7] или с определенной национальной принадлежностью [8], исследований на животных [9], симуляции поведения препарата в организме у беременных женщин [10], исследования и моделирования межлекарственного взаимодействия [11] и многих других экспериментов. Также использование PBPK целесообразно при разработке воспроизведенных лекарственных средств на этапе скринин-

га кандидатов для проведения клинических исследований [12]. Данный подход снижает риски получения неожиданных результатов исследований, особенно для лекарственных препаратов, требующих особенно тщательного подхода при разработке готовой лекарственной формы, в том числе препаратов с действующими веществами II или IV класса по БКС.

Именно ко II классу БКС и принадлежит деферализокс (рисунок 3) – специфический, высокоселективный хелатор железа, который не вызывает экскрецию цинка или меди [13, 14]. Помимо этого, стоит отметить, что вещество обладает слабыми кислотными свойствами и относится к подклассу «а» (acid), что, в свою очередь, обуславливает низкую растворимость в фармакопейной среде со значением pH 1,2.

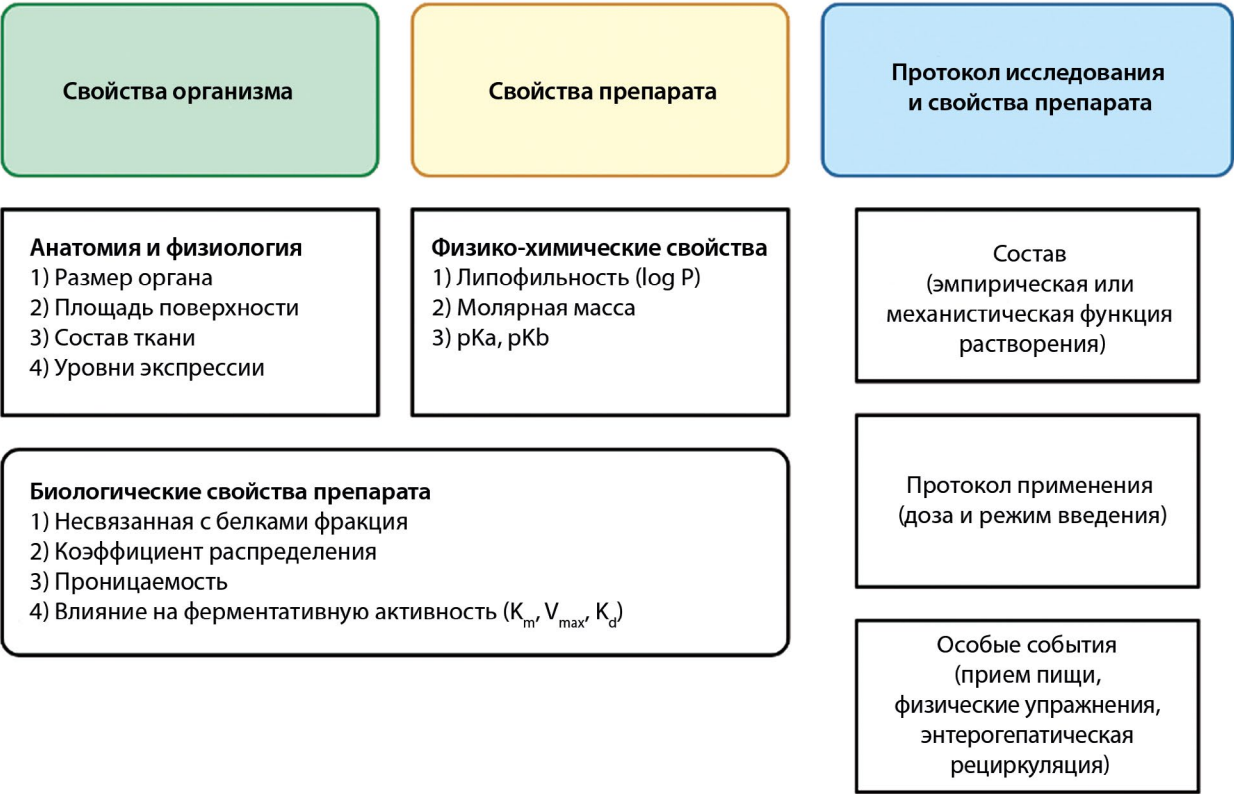


Рисунок 2. Блоки, являющиеся частью ФОФМ

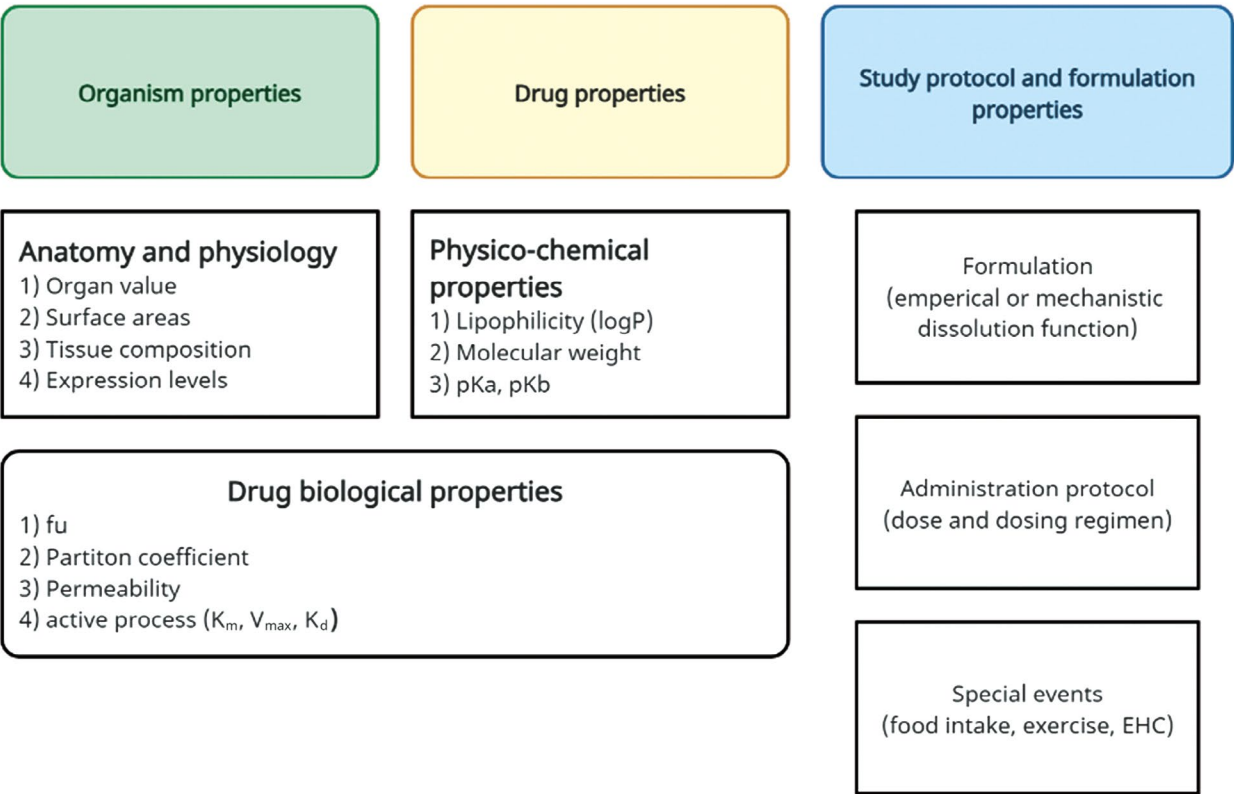


Figure 2. Blocks of a PBPK model

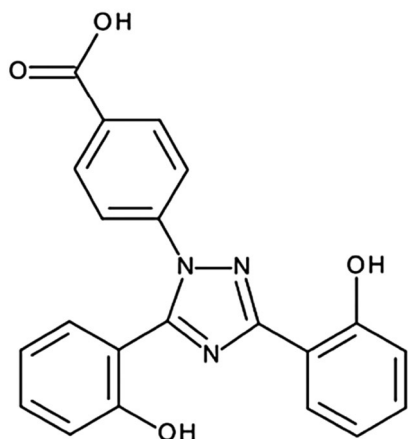


Рисунок 3. Структурная формула деферазирокса

Figure 3. Chemical structure of deferazirox

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования являлись препараты «Деферазирокс, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 360 мг» отечественного производителя и «Джадену®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 360 мг» (серия WTN22, срок годности до 10.2023, Novartis Pharma Stein AG, Швейцария).

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: вода очищенная, тип I; хлористоводородная кислота (HCl) концентрированная (класс «х.ч.», ООО «Сигма Тек», Россия); ортофосфорная кислота (H₃PO₄) концентрированная (класс «for HPLC», Scharlau, Испания); натрия гидроксид (NaOH) (класс «ч.д.а.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрий фосфорнокислый 1-замещенный (NaH₂PO₄ · 2H₂O), двухводный (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия хлорид (NaCl) (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); 3F Powder (Biorelevant, Великобритания); ацетонитрил (ACN) (класс «HPLC gradient grade», Biosolve, Франция).

Оборудование и программное обеспечение

Физиологически релевантный тест проводили на приборе СК ФРТ-6 (ООО «Сайнтифик Комплайнс», Россия). Хроматографическое разделение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия), оснащенном термостатом колонок, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором. Моделирование фармакокинетических профилей производилось с использованием про-

граммного обеспечения PK-Sim® (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики проведения физиологически релевантного теста

Важной особенностью веществ, обладающих кислотными свойствами (подкласс «а», БКС), является низкая растворимость в кислой среде, что в случае деферазирокса подтверждалось на основании литературных данных и тестов *in vitro*. В связи с этим последовательная схема проведения ФРТ не является релевантной, поскольку из-за низкой растворимости действующее вещество не попадает в последующие отделы аппарата и происходит искажение результатов. Именно поэтому для субстанций II класса БКС, подклассов «а», «ас» и «с», более физиологичной является схема теста, представленная на рисунке 4.

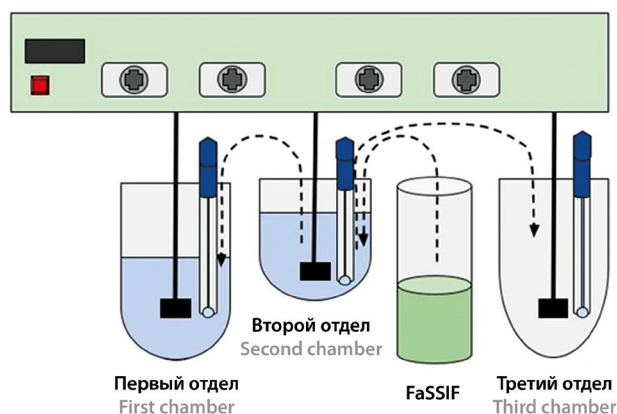


Рисунок 4. Схема аппарата для проведения ФРТ

Figure 4. Scheme of the PRT

Первый отдел аппарата имитирует желудок. В начале испытания объем этого отдела равен 0 мл. Далее в данный отдел по уравнению кинетики первого порядка осуществляется транзит желудочного сока из второго отдела и к 40-й минуте объем содержимого составил 250 мл. Данный объем первого отдела сохраняется до окончания теста.

Второй отдел имитирует транзит препарата из желудка в 12-перстную кишку. Механизм транзита реализован следующим образом: вначале в отдел помещалось 50 мл FaSSGF и 250 мл воды (стакан воды, которым запивают таблетку), значение pH этой смеси составляет около 2,84 (данные стартовые условия имитируют желудок натощак после приема пре-

парата). Далее происходило опорожнение этого отдела по уравнению кинетики первого порядка, время полного опорожнения (до объема 50 мл) составляло 40 минут [15].

Начиная с 40-й по 55-ю минуту в отдел секретируется среда растворения FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid) до объема 75 мл, что имитирует транзит из желудка в 12-перстную кишку. Значение объема сохранялось на протяжении всего теста, поскольку данный объем является физиологически релевантным и отражен в публикациях [16].

Третий отдел аппарата имитирует кишечник и служит для сбора секрета из второго отдела. Его объем увеличивался с 40-й минуты до конца теста. Стартовый объем был равен 0 мл.

На рисунке 5 представлены объемы отделов в различных временных точках.

Количественное определение деферазирокса в образцах, полученных при проведении ФРТ, проводили методом ВЭЖХ-УФ. На основании полученных данных были построены усредненные графики «% высвобождения лекарственного вещества – время» (рисунки 6 и 7).

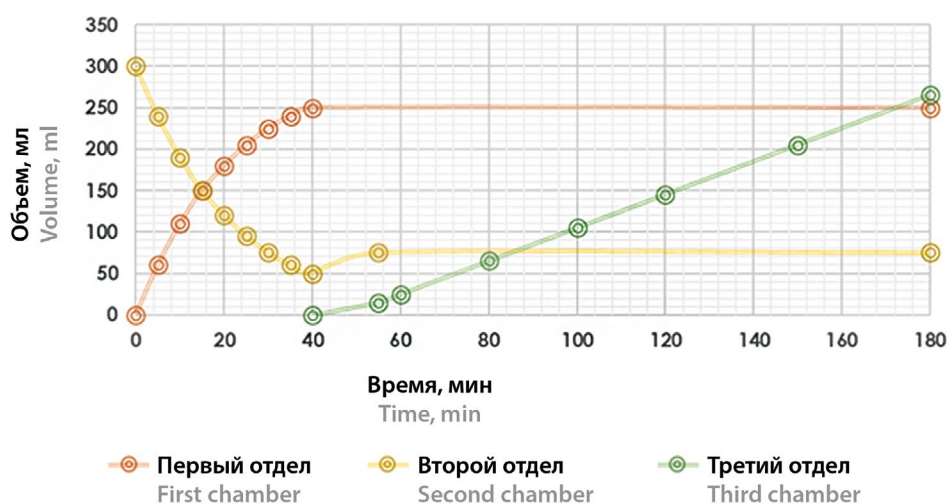


Рисунок 5. Диаграммы объемов отделов в разных временных точках

Figure 5. Diagram of the volume in different time point

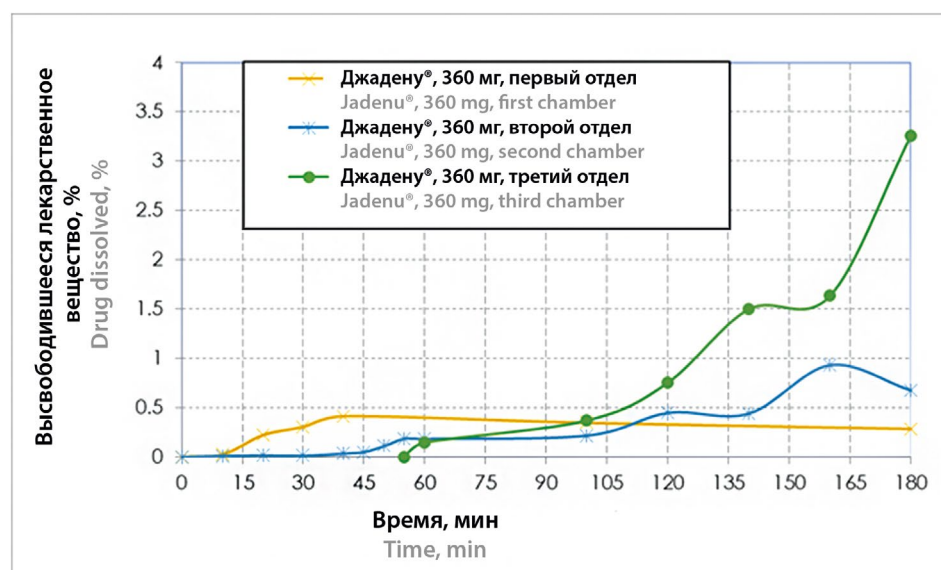


Рисунок 6. Усредненные профили растворения деферазирокса в лекарственном средстве «Джадену», таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 360 мг» (серия WTN22) в трех отделах аппарата

Figure 6. Average dissolution profiles of deferazirox in "Jadenu", film-coated tablets, 360 mg" (batch WTN22) in three chambers

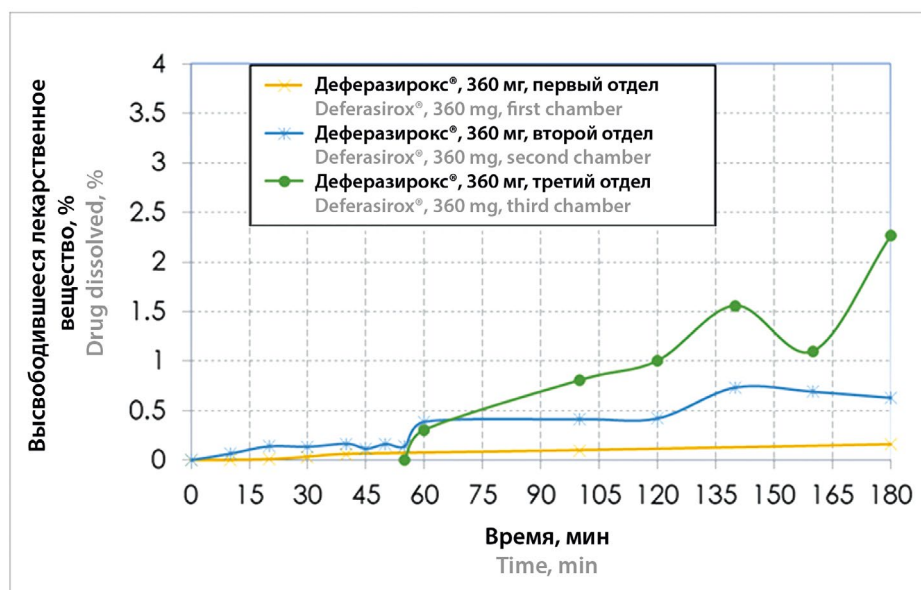


Рисунок 7. Усредненные профили растворения деферазирокса в лекарственном средстве «Деферазирокс, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 360 мг» в трех отделах аппарата

Figure 7. Average dissolution profiles of deferasirox in "Deferasirox, film-coated tablets, 360 mg" in three chambers

Построение фармакокинетических профилей на основе данных *in vitro*

Существует множество программ, позволяющих производить физиологически обоснованное фармакокинетическое моделирование, однако в нашей работе использовалось программное обеспечение PK-Sim® (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Германия).

В основе данного программного обеспечения лежит структура, включающая в себя 18 органов и тканей и позволяющая имитировать процессы абсорбции, распределения, метаболизма и выделения при различных способах введения препарата [17].

В PK-Sim® пероральное всасывание реализовано с помощью модели, которая включает в себя тонкий кишечник как единый, непрерывный отдел с пространственно изменяющимися свойствами. Прохождение примененной дозы вещества описывается функцией опорожнения желудка, зависящей от приема пищи, и транзитной функцией, описывающей перенос лекарственной формы, через кишечник. В каждый момент времени рассчитывается количество вещества, всосавшегося в воротную вену. Для твердых лекарственных форм высвобождение вещества в раствор либо предполагается мгновенным (для лекарственных форм с немедленным высвобождением), либо может быть описано в соответствии с предустановленными в программе моделями растворения, либо может задаваться пользовательскими функциями высвобождения [18].

Для построения РВРК-модели деферазирокса использовались данные о проценте высвобождения ЛВ, полученные при проведении ФРТ, литератур-

ные данные о физико-химических и биологических свойствах изучаемого соединения (таблица 1), а также данные о фармакокинетике деферазирокса в организме человека.

Таблица 1. Параметры, использованные в ФОФМ

Table 1. Summary of parameters used in PBPK model

Параметр Parametr	Значение Value
MW	373,362 г/моль 373.362 g/mol
Log P	3,52
fu	1 %
pKa	4,57
Растворимость при pH = 6,8 Dissolution at pH = 6.8	0,04 мг/мл 0.04 mg/ml
Фермент, участвующий в метаболизме Metabolizing enzyme	UGT1A1
Транспортный белок Transport protein	BCRP, cMOAT

Поскольку целью испытания было изучение сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов деферазирокса *in vitro*, то фармакокинетические кривые строились не для одного виртуального субъекта, а для целой виртуальной популяции, что максимально моделирует реальные клинические исследования. Виртуальная популяция состояла из европеоидов в возрасте от 18 до 50 лет, ростом от 168 до 190 см, массой тела в диапазоне 55–85 кг, половину популяции составляли женщины.

Виртуальный протокол приема препарата следующий: единовременный прием таблетки деферазирокса дозировкой 360 мг натощак.

В результате введения всех необходимых данных в программу были получены фармакокинетические профили, представленные на рисунке 8. Черной линией на рисунке представлены среднегеометрические значения концентраций для препарата «Джадену[®]», таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 360 мг (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария), красной – для препарата «Деферазирокс, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 360 мг» отечественного производства. Фармакокинетические профили, полученные при проведении клинических исследований, представлены на рисунке 9.

В таблице 2 представлены значения отношений среднегеометрических значений фармакокинетических параметров исследуемого лекарственного препарата к референтному лекарственному препарату и рассчитанная погрешность прогнозирования.

Паттерн расположения фармакокинетических профилей препарата «Джадену[®]» и препарата «Деферазирокс» одинаков как на графиках, полученных в рамках проведения клинических исследований, так и на графиках, полученных при проведении моделирования.

Дальнейший интерес представляет доработка методологии проведения испытания ФРТ для снижения ошибки прогнозирования при моделировании фармакокинетических профилей.

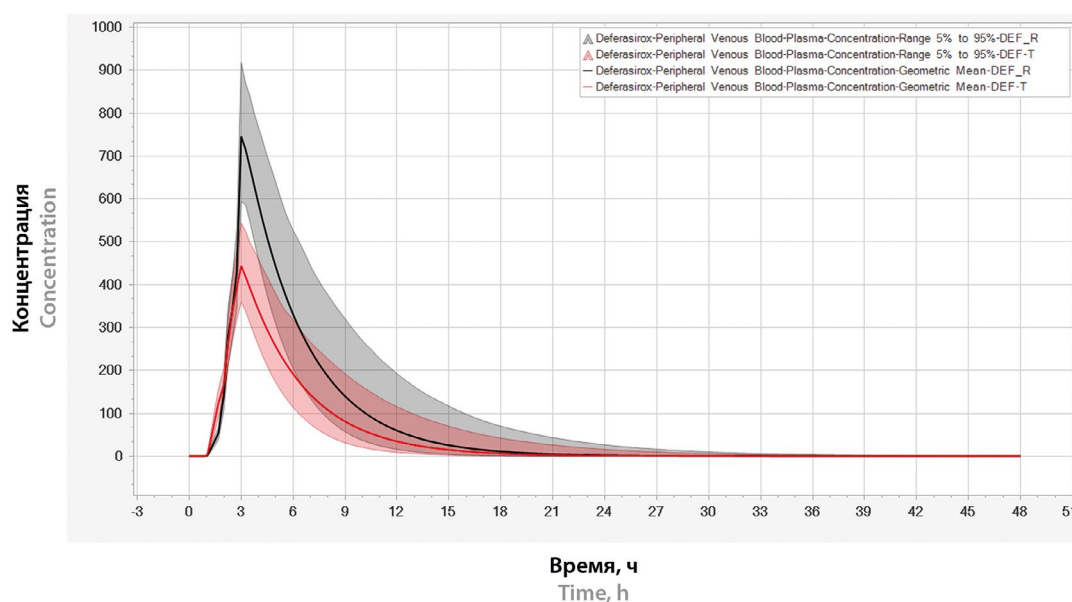


Рисунок 8. Смоделированные фармакокинетические профили для исследуемых препаратов

Figure 8. Modeled pharmacokinetic profiles for study drugs

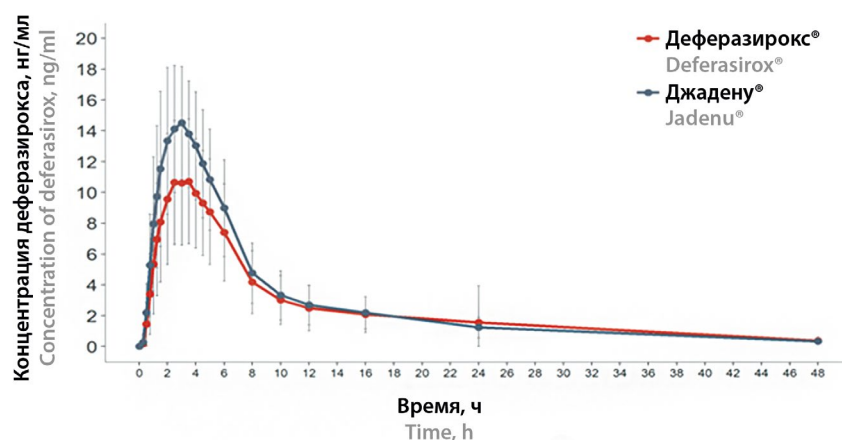


Рисунок 9. Фармакокинетические профили для исследуемых препаратов, полученные в рамках проведения клинических исследований

Figure 9. Pharmacokinetic profiles for the study drugs obtained in the context of clinical trials

Таблица 2. Значения отношений среднегеометрических значений фармакокинетических параметров исследуемого лекарственного препарата к референтному лекарственному препарату

Table 2. Values of the ratio of the geometric mean values of the pharmacokinetic parameters of the test drug to the reference drug

Параметр Parameter	Данные, полученные при проведении клинических исследований Data from clinical trials	Данные, полученные в рамках симуляции Data from the simulation	Погрешность прогнозирования для отношения геометрических средних T/R, % Prediction error (PE) for geometric mean ratio T/R, %
AUC _{0-t}	0,85	0,63	-34,9
C _{max}	0,74	0,60	-23,3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана методика проведения физиологически релевантного теста для лекарственного препарата с действующим веществом, относящимся ко II классу БКС. Количественное определение деферазирокса в образцах проводилось методом ВЭЖХ-УФ. По результатам были получены профили растворения деферазирокса, которые легли в основу физиологически обоснованной фармакокинетической модели совместно с данными о физико-химических свойствах изучаемого соединения и литературными данными о фармакокинетике деферазирокса. Полученные в рамках симуляции на виртуальной популяции фармакокинетические профили схожи с данными, полученными при проведении клинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Zhuang X., Lu C. PBPK modeling and simulation in drug research and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016;6(5):430–440. DOI: 10.1016/j.apsb.2016.04.004.
2. Bois F. Y., Jamei M., Clewell H. J. PBPK modelling of inter-individual variability in the pharmacokinetics of environmental chemicals. *Toxicology*. 2010;278(3):256–267. DOI: 10.1016/j.tox.2010.06.007.
3. Kuepfer L., Niederalt C., Wendl T., Schlender J.-F., Willmann S., Lippert J., Block M., Eissing T., Teutonico D. Applied Concepts in PBPK Modeling: How to Build a PBPK/PD Model. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2016;5(10):516–531. DOI: 10.1002/psp4.12134.
4. Dallmann A., Solodenko J., Ince I., Eissing T. Applied Concepts in PBPK Modeling: How to Extend an Open Systems Pharmacology Model to the Special Population of Pregnant Women. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2018;7(7):419–431. DOI: 10.1002/psp4.12300.
5. Björkman S. Prediction of drug disposition in infants and children by means of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling: theophylline and midazolam

- as model drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2005;59(6):691–704. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2004.02225.x.
6. Hsueh C.-H., Hsu V., Zhao P., Zhang L., Giacomini K. M., Huang S.-M. PBPK modeling of the effect of reduced kidney function on the pharmacokinetics of drugs excreted renally by organic anion transporters. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2018;103(3):485–492. DOI: 10.1002/cpt.750.
7. Cheeti S., Budha N. R., Rajan S., Dresser M. J., Jin J. Y. A physiologically based pharmacokinetic (PBPK) approach to evaluate pharmacokinetics in patients with cancer. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2013;34(3):141–154. DOI: 10.1002/bdd.1830.
8. Zhou L., Sharma P., Yeo K. R., Higashimori M., Xu H., Al-Huniti N., Zhou D. Assessing pharmacokinetic differences in Caucasian and East Asian (Japanese, Chinese and Korean) populations driven by CYP2C19 polymorphism using physiologically-based pharmacokinetic modelling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;139:105061. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105061.
9. Sarangapani R., Teeguarden J., Andersen M. E., Reitz R. H., Plotzke K. P. Route-specific differences in distribution characteristics of octamethylcyclotetrasiloxane in rats: analysis using PBPK models. *Toxicological Sciences*. 2003;71(1):41–52. DOI: 10.1093/toxsci/71.1.41.
10. Ke A. B., Nallani S. C., Zhao P., Rostami-Hodjegan A., Unadkat J. D. A PBPK model to predict disposition of CYP3A-metabolized drugs in pregnant women: verification and discerning the site of CYP3A induction. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2012;1(9):1–10. DOI: 10.1038/psp.2012.2.
11. Duan P., Zhao P., Zhang L. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of pitavastatin and atorvastatin to predict drug-drug interactions (DDIs). *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2017;42:689–705. DOI: 10.1007/s13318-016-0383-9.
12. Jones H. M., Gardner I. B., Watson K. J. Modelling and PBPK Simulation in Drug Discovery. *The AAPS Journal*. 2009;11(1):155–166. DOI: 10.1208/s12248-009-9088-1.
13. Tanaka C. Clinical pharmacology of deferazirox. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014;53(8):679–694. DOI: 10.1007/s40262-014-0151-4.
14. Farmoudeh A., Rezaeirosan A., Abbaspour M., Nokhodchi A., Ebrahimnejad P. Solid dispersion pellets: an efficient pharmaceutical approach to enrich the solubility and dissolution rate of deferazirox. *BioMed research international*. 2020;2020(1):8583540. DOI: 10.1155/2020/8583540.
15. Koziolok M., Grimm M., Becker D., Iordanov V., Zou H., Shimizu J., Wanke C., Garbacz G., Weitschies W. Investigation of pH and temperature profiles in the GI tract of fasted human subjects using the Intellicap® system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(9):2855–2863. DOI: 10.1002/jps.24274.
16. Kerlin P., Zinsmeister A., Phillips S. Relationship of motility to flow of contents in the human small intestine. *Gastroenterology*. 1982;82(4):701–706. DOI: 10.1016/0016-5085(82)90314-6.
17. Willmann S., Thelen K., Lippert J. Integration of dissolution into physiologically-based pharmacokinetic models III: PK-Sim®. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;64(7):997–1007. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01534.x.
18. Willmann S., Lippert J., Sevestre M., Solodenko J., Fois F., Schmitt W. PK-Sim®: a physiologically based pharmacokinetic ‘whole-body’ model. *BIO-SILICO*. 2003;1(4):121–124. DOI: 10.1016/s1478-5382(03)02342-4.



Подходы к проведению физиологически релевантного теста (ФРТ) при изучении лекарственных препаратов, содержащих вещество подкласса IIc БКС, на примере сорафениба

А. В. Суворова¹✉, Ю. В. Медведев^{1, 2}, П. А. Лосенкова^{1, 2}, О. С. Крамаренко¹,
Е. А. Малащенко^{2, 3}, А. М. Полуянов^{1, 2}, И. Е. Шохин³

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс». 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8., помещ. 1/2

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

³ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

✉ Контактное лицо: Суворова Александра Вадимовна. E-mail: info@scientific-compliance.ru

ORCID: А. В. Суворова – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;
Ю. В. Медведев – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>;
П. А. Лосенкова – <https://orcid.org/0009-0005-2391-5267>;
О. С. Крамаренко – <https://orcid.org/0009-0004-4406-1574>;
Е. А. Малащенко – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>;
А. М. Полуянов – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>;
И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 08.07.2024

Статья принята в печать: 26.08.2024

Статья опубликована: 26.08.2024

Резюме

Введение. Сорафениб – противоопухолевое лекарственное средство, относящееся к классу IIc по биофармацевтической классификационной системе (БКС) за счет наличия и кислотных, и основных свойств. Кроме низкой растворимости, сорафениб характеризуется высокой вариабельностью при проведении клинических исследований, в частности исследований биоэквивалентности (БЭ). Для целей выбора серий, которые могут быть рекомендованы при проведении исследований БЭ, в настоящее время широко применяется тест кинетики растворения, однако результатов данного теста не всегда достаточно и проведение дополнительных тестов, например физиологически релевантного теста, является целесообразным. Для минимизации рисков получения неэквивалентных результатов при проведении исследования БЭ был проведен физиологически релевантный тест (ФРТ) с дальнейшей обработкой данных и интерпретацией результатов физиологически обоснованного фармакокинетического моделирования (ФОФМ).

Цель. Целью исследования является проведение физиологически релевантного теста (ФРТ) для целей выбора с применением ФОФМ (физиологически обоснованное фармакокинетическое моделирование, physiologically based pharmacokinetic model, PBPK) серии-кандидата для последующего исследования БЭ препаратов сорафениба.

Материалы и методы. Объектами исследования являются «Нексавар[®], таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 200 мг» (одна серия) (Bayer AG, Германия) и «Сорафениб, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 200 мг» (две серии) (Россия). Физиологически релевантный тест проводили на приборе СК ФРТ-6 (ООО «Сайнтифик Комплайнс», Россия). Количественный анализ проводили методом ВЭЖХ-УФ на приборе «Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия). Моделирование профилей «плазма – концентрация» проводилось с помощью программного обеспечения PK-Sim[®] (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Германия).

Результаты и обсуждение. В рамках выполнения исследований была разработана и валидирована методика количественного определения сорафениба, разработана методика пробоподготовки и методика проведения ФРТ для сорафениба как представителя подкласса IIc БКС. По результатам исследования получены профили высвобождения, которые были использованы для целей выбора серии кандидата для проведения исследования БЭ. Выбор серий производился на основании ФОФМ-анализа на виртуальной популяции, состоящей из 36 здоровых добровольцев с активированной энтеропатической циркуляцией, характерной для сорафениба.

Заключение. Проведен ФРТ для препарата сорафениб. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ-УФ по разработанной и валидированной методике. В результате проведения теста были получены данные, подвергнутые ФОФМ-анализу. Было показано, что исследованные серии имеют высокие риски получения результатов с недоказанной эквивалентностью при проведении клинического исследования.

Ключевые слова: сорафениб, HPLC, SC Powder, ФОФМ

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

Вклад авторов. Ю. В. Медведев принимал участие в разработке аналитической методики количественного определения сорафениба. П. А. Лосенкова отвечала за проведение аналитического этапа исследования. А. В. Суворова и Е. А. Малашенко проводили статистическую обработку данных. А. М. Полуянов отвечал за разработку и научное обоснование эксперимента. О. С. Крамаренко и И. Е. Шохин отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Суворова А.В., Медведев Ю.В., Лосенкова П.А., Крамаренко О.С., Малашенко Е.А., Полуянов А.М., Шохин И.Е. Подходы к проведению физиологически релевантного теста (ФРТ) при изучении лекарственных препаратов, содержащих вещество подкласса IIc БКС, на примере сорафениба. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):176–185. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1900>

Approaches to conducting a physiologically relevant test (PRT) in the study of medicines containing substance IIc of the BCS subclass using sorafenib as an example

Alexandra V. Suvorova¹✉, Yuri V. Medvedev^{1,2}, Polina A. Losenkova^{1,2}, Olga S. Kramarenko¹, Eugenia A. Malashenko^{2,3}, Andrey M. Poluyanov^{1,2}, Igor E. Shohin³

¹ Limited Liability Company "Scientific Compliance". 1/2, 8, Simferopolsky bulvar, 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 Limited Liability Company "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopolsky bulvar, Moscow, 117246, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexandra V. Suvorova. **E-mail:** info@scientific-compliance.ru

ORCID: Alexandra V. Suvorova – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;

Yuri V. Medvedev – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>;

Polina A. Losenkova – <https://orcid.org/0009-0005-2391-5267>;

Olga S. Kramarenko – <https://orcid.org/0009-0004-4406-1574>;

Eugenia A. Malashenko – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>;

Andrey M. Poluyanov – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>;

Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 08.07.2024

Accepted: 26.08.2024

Published: 26.08.2024

Abstract

Introduction. Sorafenib is an antineoplastic drug belonging to class IIc according to the biopharmaceutical classification system (BCS) due to the presence of both acidic and basic properties. In addition to low solubility, sorafenib is characterized by high variability during clinical trials, in particular bioequivalence studies (BE). To selecting batches that can be recommended for BE studies, the dissolution kinetics test is currently widely used, however, the results of this test are not always sufficient and additional tests, for example, a physiologically relevant test, are advisable. To minimize the risks of obtaining nonequivalent results during the BE study, a physiologically relevant test (PRT) was carried out with further data processing and interpretation of the results of physiologically based pharmacokinetic modeling (PBPK).

Aim. The aim of the study is to conduct a physiologically relevant test (PRT) for the purpose of selecting a candidate batch for subsequent BE study of sorafenib drugs using the physiologically based pharmacokinetic model (PBPK).

Materials and methods. The objects of the study are Nexavar®, film-coated tablets, 200 mg (Bayer AG, Germany) (one batch) and Sorafenib, film-coated tablets, 200 mg (two batches) (Russia). The physiologically relevant test was performed on the SC PRT-6 device (LLC "Scientific Compliance", Russia). Quantitative analysis was performed by HPLC-UV on the Chromatec-Crystal HPLC 2014 device (CJSC "Chromatec", Russia). The plasma concentration profiles were simulated using PK-Sim® software (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Germany).

Results and discussion. As part of the study, a method for the quantitative determination of sorafenib was developed and validated, a method for sample preparation was developed, and a method for conducting the PRT for sorafenib, as a representative of the IIc subclass of BCS, was developed. Based on the study results, release profiles were obtained that were used to select a candidate series for the BE study. The series were selected based on the PBPK analysis on a virtual population consisting of 36 healthy volunteers with activated enteropathic circulation, characteristic of sorafenib.

Conclusion. The PRT was carried out for the drug sorafenib. Quantitative determination was carried out by HPLC-UV according to the developed and validated method. The test resulted in obtaining data that were subjected to PBPK analysis. It was shown that the studied batches have high risks of non-equivalence during the bioequivalence study.

Keywords: sorafenib, HPLC, SC Powder, PBPK

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. Yuri V. Medvedev participated in the development of the analytical method for the quantitative determination of sorafenib. Polina A. Losenkova was responsible for the analytical stage of the study. Alexandra V. Suvorova and Eugenia A. Malashenko performed statistical processing of the data. Andrey M. Poluyanov was responsible for the development and scientific justification of the experiment. Olga S. Kramarenko and Igor E. Shohin were responsible for the organizational part of the study. All the above-mentioned authors participated in the discussion of the obtained results in the form of a scientific discussion.

For citation: Suvorova A. V., Medvedev Yu. V., Losenkova P. A., Kramarenko O. S., Malashenko E. A., Poluyanov A. M., Shohin I. E. Approaches to conducting a physiologically relevant test (PRT) in the study of medicines containing substance IIc of the BCS subclass using sorafenib as an example. *Drug development & registration*. 2024;13(3):176–185. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1900>

ВВЕДЕНИЕ

Фармацевтическая разработка является важным этапом подготовки лекарственного препарата к проведению исследования биоэквивалентности с целью государственной регистрации. После получения готовой лекарственной формы разработчики сталкиваются с важной задачей – выбором серии препарата, которая будет сравниваться с референтным лекарственным препаратом (ЛП). Для снижения рисков получения неэквивалентных результатов применяются различные методы, например проведение теста сравнительной кинетики растворения (ТСКР) в средах, моделирующих различные отделы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Результаты данного теста, знание класса БКС и учет биофармацевтических свойств исследуемого лекарственного вещества (ЛВ) позволяют повысить точность выбора исследуемой серии для исследований биоэквивалентности [1–3].

С целью получения дополнительной информации, помимо ТСКР, разрабатываются и вводятся в сферу фармацевтического анализа другие методы – GIS (gastro intestinal simulation system), TIM (TNO Gastro-Intestinal Model), компьютерное моделирование [4]. Данные методы позволяют моделировать поведение лекарственных средств (ЛС) в ЖКТ в различных условиях, например, появляется функция физиологического трансфера из одного отдела в другой, учитывается выделение желчи, прием пищи и многое другое [5–10]. Физиологически релевантный тест (ФРТ) – это следующая ступень *in-vitro*-тестов, позволяющая дать дополнительную информацию об исследуемом ЛС перед проведением исследований биоэквивалентности. Особенно полезно проведение ФРТ для ЛВ с

высокой вариабельностью и для ЛВ, относящихся ко II и отчасти к IV классу БКС. В процессе выполнения ФРТ происходит распад и высвобождение ЛВ и последовательный трансфер в последующие отделы, моделирующие ЖКТ.

Важной особенностью проведения ФРТ является то, что применяют среды, более близкие к физиологическим, нежели «обязательные» в соответствии с действующим законодательством в ТСР среды (раствор соляной кислоты с pH 1,2, буферные растворы с pH 4,5 и 6,8) [11, 12]. В ФРТ рекомендуется применять биорелевантные среды, в частности Fasted State Simulated Gastric Fluid (FaSSGF), Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF), Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF), содержащие таурохолат натрия и лецитин или вариации с ПАВ [13–16]. Применение ФРТ в биорелевантных средах дает результаты, которые в сочетании с различными видами математического моделирования, например физиологически обоснованным фармакокинетическим моделированием (physiologically based pharmacokinetic modelling, PBPK), или ФОФМ, позволяют описывать фармакокинетику веществ на основе их физико-химических свойств и физиологии человека или животных [17–19].

Проведение ФРТ наиболее целесообразно для малорастворимых веществ, одним из которых является сорафениб, для которого $\log P = 3.8$ [20]. Сорафениб относится ко II классу БКС и за счет наличия и кислотных, и основных свойств относится к подклассу «с» [21, 22]. В связи с полиморфизмом [23] сорафениб характеризуется высокой вариабельностью, что делает данное вещество интересным объектом для

проведения ФРТ для целей фармацевтической разработки и последующего проведения ФОФМ-исследования.

Структурная формула сорафениба приведена на рисунке 1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования являлись препараты «Нексавар[®], таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 200 мг» (одна серия) (Bayer AG, Германия) и препарат «Сорафениб, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 200 мг» (две серии) (Россия); все исследуемые препараты были с актуальными сроками годности.

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: вода очищенная, тип I; хлористоводородная кислота концентрированная (класс «ос.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); ортофосфорная кислота концентрированная (класс «Food and pharma grade», neoFroxx GmbH, Германия); натрия гидроксид (класс «ч.д.а.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрий фосфорнокислый 1-замещенный, двухводный (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия хлорид (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); SC Powder (ООО «Сайнтифик Комплайнс», Россия); ацетонитрил (класс «HPLC gradient grade», Alpha Chemika, Индия).

Оборудование и программное обеспечение

Физиологически релевантный тест проводили на приборе СК ФРТ-6 (ООО «Сайнтифик Комплайнс», Россия). Хроматографическое разделение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия), оснащенном термостатом колонок, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения «Хроматэк аналитик» 214.00045.51.

Моделирование профилей «плазма – концентрация» проводилось с помощью программного обеспечения PK-Sim[®] (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Германия).

Условия хроматографирования

Хроматографическое разделение проводили на хроматографической колонке GL Sciences InertSustain C18, 4,6 × 100 мм, 5 мкм, в режиме градиентного разделения. Подвижная фаза А – 0,2%-й раствор муравьиной кислоты, подвижная фаза В – ацетонитрил. Скорость потока – 0,8 мл/мин, температура колонки – 40 °С, детектирование проводили при 262 нм, объем вводимой пробы – 5 мкл. Время анализа одной пробы – 6,1 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики проведения физиологически релевантного теста

Сорафениб относится ко второму классу БКС и согласно базе данных FDA Dissolution Database он растворяется в среде 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты в присутствии натрия лаурилсульфата. С учетом свойств сорафениба и информации о фармакокинетики для него целесообразно применять модифицированную схему проведения ФРТ, когда желудок моделирует второй отдел аппарата, в который и помещается ЛП.

ФРТ проводился с использованием модифицированного аппарата II «Лопастная мешалка» с двумя радиальными отверстиями при скорости вращения 25 об/мин с периодическим ускорением до 180 об/мин. В каждый сосуд, имитирующий отдел желудка (второй отдел), помещали по 1 таблетке испытуемых лекарственных препаратов. Лопасты опускали в сосуды для растворения. На начальном этапе объем среды растворения составлял в первом и третьем отделе (стакане) 0 мл и 300 мл смеси среды FaSSGF с водой очищенной – во втором отделе (стакане). Перед запуском все сосуды были предварительно термостатированы при 37 ± 0,5 °С.

Схема ФРТ

Первый отдел аппарата имитирует желудок после трансфера ЛП в последующие отделы ЖКТ. В начале испытания отдел не заполнен и за счет транзита желудочного сока из второго отдела наполняется по уравнению кинетики первого порядка. К 40-й минуте объем содержимого первого отдела достигает 250 мл и сохраняется до конца исследования.

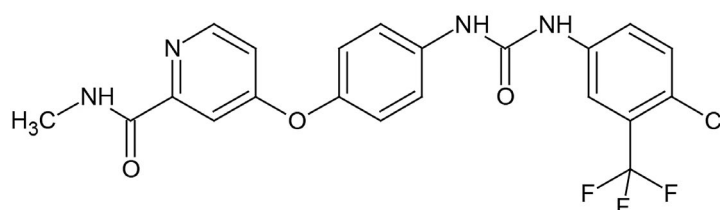


Рисунок 1. Структурная формула сорафениба

Figure 1. Chemical structure of sorafenib

Второй отдел на начальном этапе теста имитирует желудок, а в дальнейшем 12-перстную кишку, за счет чего моделируется трансфер ЛП по ЖКТ. Механизм транзита реализован следующим образом: вначале в отдел помещают ЛП и смесь 50 мл FaSSGF и 250 мл воды (стакан воды, которым запивают таблетку), значение pH этой смеси составляет около 2,84 (данные стартовые условия имитируют желудок натощак после приема препарата). Далее происходит опорожнение этого отдела в первый отдел по уравнению кинетики первого порядка, скорость полного опорожнения (до объема 50 мл) составляет 40 минут. С 40-й по 55-ю минуту во второй отдел секретируется среда растворения FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid) до объема 75 мл, что имитирует транзит ЛП из желудка в 12-перстную кишку. Значение объема отдела сохраняется на протяжении всего теста.

Третий отдел аппарата имитирует кишечник и служит для сбора секрета из второго отдела. Его объем увеличивается с 40-й минуты до конца теста за счет трансфера содержимого второго отдела. Стартовый объем равен 0 мл.

Спустя заданные промежутки времени автоматически проводился отбор по 1,0 мл среды из соответствующего отдела. После отбора проводилась необходимая пробоподготовка образцов и определялось количество растворившегося сорафениба методом ВЭЖХ-УФ. Физиологически релевантный тест исследуемых лекарственных средств и референтного ЛП проводили параллельно, на 6 единицах каждого лекарственного средства.

Разработка методики пробоподготовки образцов при проведении ФРТ

Особенностью проведения модифицированной (гибридной) схемы ФРТ для малорастворимых ЛВ является наличие большого количества взвешенных частиц в образце. Другая особенность таких проб состоит в том, что получающийся раствор является насыщенным, и при охлаждении в процессе нахождения в лотке автосамплера может происходить снижение растворимости вещества, что будет сопровождаться уменьшением концентрации. Для предотвращения изменения концентрации в растворе и получения недостоверных данных была разработана следующая методика пробоподготовки: после отбора аликвоты отстаивали до полного осаждения взвеси, аккуратно отбирали 750 мкл надосадочной жидкости и к ней прибавляли 750 мкл ацетонитрила, тщательно перемешивали и полученный раствор фильтровали через шприцевые фильтры в хроматографические вials.

Разработка методики количественного определения сорафениба в образцах, полученных при проведении ФРТ

Физиологический релевантный тест проводится в сравнительно небольших объемах среды растворения. Сорафениб, как вещество с низкой раство-

римостью, в условиях ФРТ образует растворы с небольшими концентрациями, в результате возникает необходимость разработки и валидации методики для количественного определения действующего вещества с диапазоном, заметно отличающимся от методик количественного определения, например, в ТСР.

Методика была валидирована по следующим параметрам: специфичности, градуировочной кривой (линейности), правильности и повторяемости внутри 1 аналитического цикла, правильности и прецизионности между аналитическими циклами, стабильности стандартных растворов, стабильности образцов при проведении ФРТ, стабильности образцов в средах в течение 24 часов.

Линейность оценивалась на 7 уровнях в диапазоне от 1,00 до 20,00 мкг/мл, оценку точности и прецизионности, различных видов стабильности методики проводили на 4 уровнях в аналогичном диапазоне.

Методика показала удовлетворительные результаты в процессе валидации.

Результаты проведения ФРТ

На основании полученных данных были построены усредненные графики «% высвобождение лекарственного вещества – время» (рисунки 2–4).

По результатам испытания было отмечено частичное высвобождение всех лекарственных препаратов в физиологически релевантных условиях, однако полученные данные позволяют произвести сравнение для оценки подобия различных серий исследованного препарата с референтным препаратом и в дальнейшем могут быть использованы для прогнозистических задач, например проведения ФОФМ (РВРК).

Результаты проведения ФОФМ (РВРК)

Модель, описывающая сорафениб, была разработана с использованием PK-Sim® (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Германия).

За основу виртуальной популяции были взяты данные из клинического исследования¹. Виртуальная популяция состояла из 36 здоровых добровольцев европеоидной расы в возрасте от 18 до 65 лет, индекс массы тела – от 18,5 до 30 кг/м², минимальный вес для мужчин – 50,0 кг, для женщин – 45,0 кг. Для оценки профилей вне зависимости от пола количество индивидов женского и мужского пола было равно. У всех людей в популяции была активирована энтерогепатическая циркуляция, что обеспечивало непрерывный поток желчи в двенадцатиперстную кишку.

¹ Bioequivalence Study of Sorafenib Tablet and Nexavar. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02599337>. Accessed: 01.08.2024.

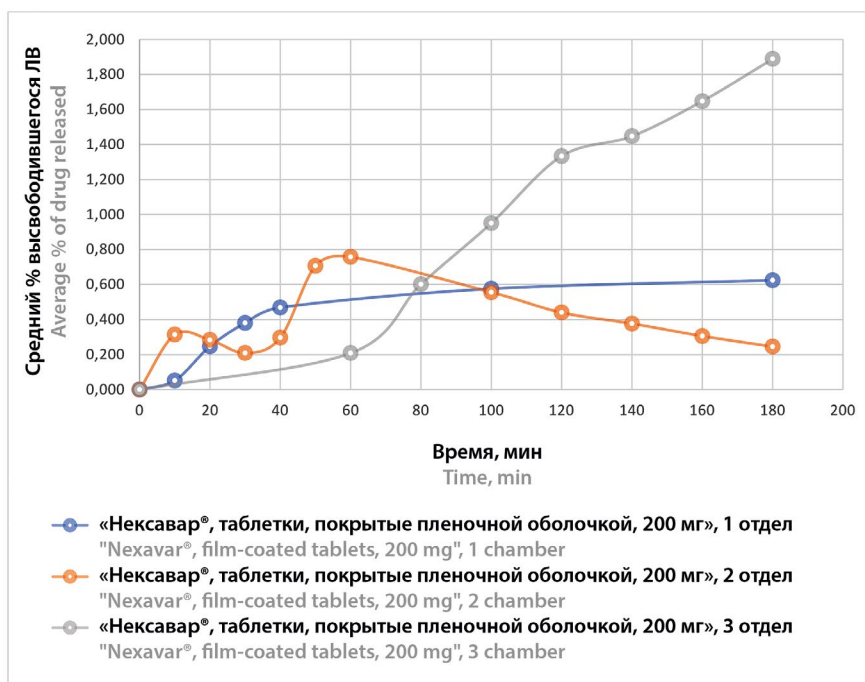


Рисунок 2. Усредненные профили растворения сорафениба в лекарственном средстве «Нексавар®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 200 мг» в трех отделах аппарата

Figure 2. Average dissolution profiles of sorafenib in the medicinal product «Nexavar®, film-coated tablets, 200 mg», in three chambers of the apparatus

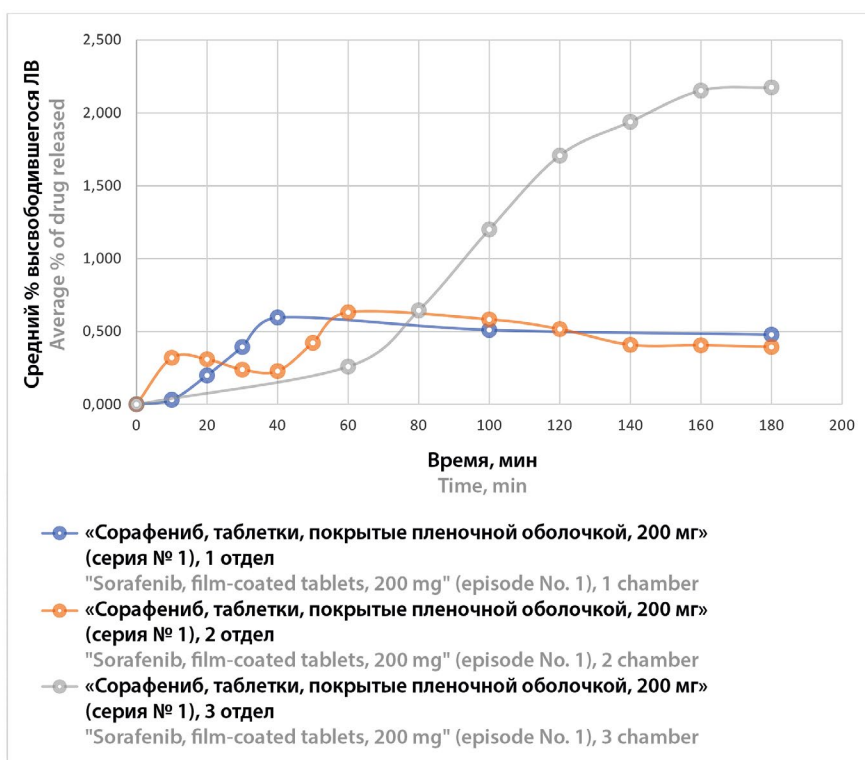


Рисунок 3. Усредненные профили растворения сорафениба в лекарственном средстве «Сорафениб, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 200 мг», серия № 1, в трех отделах аппарата

Figure 3. Average dissolution profiles of sorafenib in the medicinal product «Sorafenib, film-coated tablets, 200 mg», batch No. 1 in three chambers of the apparatus

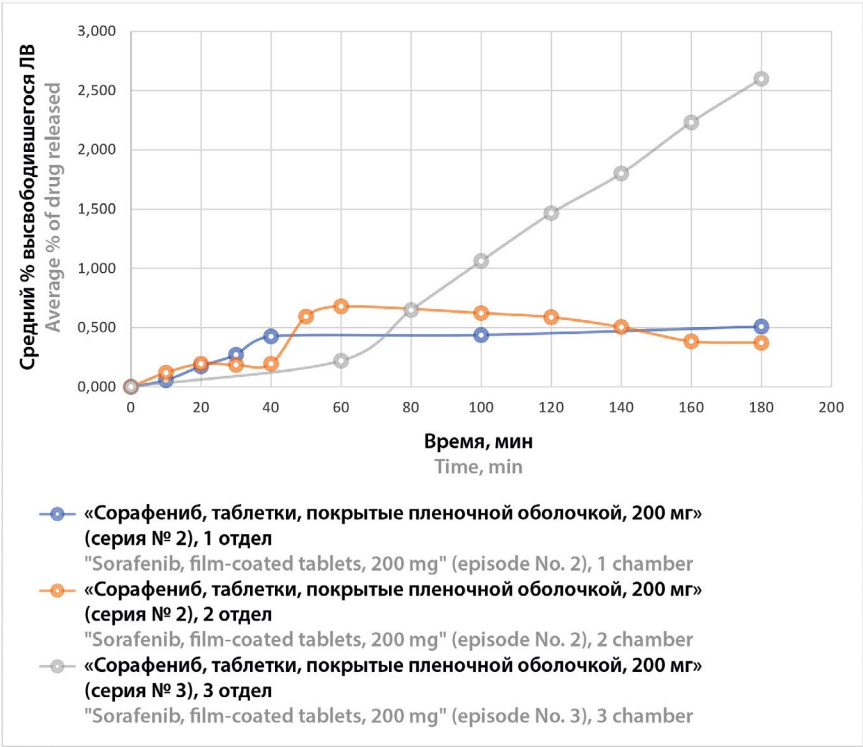


Рисунок 4. Усредненные профили растворения сорафениба в лекарственном средстве «Сорафениб, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 200 мг», серия № 2, в трех отделах аппарата

Figure 4. Average dissolution profiles of sorafenib in the medicinal product «Sorafenib, film-coated tablets, 200 mg», batch No. 2 in three chambers of the apparatus

Модель описывала следующий дизайн исследования: однократный прием натошак препаратов с действующим веществом сорафениб – таблеток, покрытых пленочной оболочкой, 200 мг.

На основании суммы данных о высвобождении во втором и третьем отделе, полученных *in vitro* для двух серий тестового препарата и одной серии референтного препарата, с помощью разработанной модели были построены фармакокинетические профили изучаемых препаратов виртуальной популяции. Соотношения основных фармакокинетических параметров для T1/R и T2/R приведены в таблице 1, а смоделированные профили – на рисунке 5.

Таблица 1. Предсказанные отношения для основных фармакокинетических параметров

Table 1. Predicted relationships for key pharmacokinetic parameters

Параметр Parameter	RATIO T1/R, %	RATIO T2/R, %
AUC _{0–inf}	156,60	123,60
AUC _{0–72}	156,40	123,60
C _{max}	163,70	140,70

Исходя из полученных профилей «концентрация – время» и соотношения среднегеометрических значений для фармакокинетических параметров

AUC_{0–inf}, AUC_{0–72}, C_{max}, было показано, что риск получения результатов с недоказанной биоэквивалентностью является высоким для обеих серий тестового препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках исследования была разработана и валидирована методика количественного определения сорафениба в образцах, полученных в результате проведения ФРТ препаратов сорафениба. Разработана и апробирована методика проведения ФРТ для лекарственного препарата с действующим веществом, относящимся к подклассу IIc БКС – сорафениб. По результатам были получены профили растворения сорафениба, которые были использованы в процессе фармацевтической разработки для целей выбора серии для проведения исследования биоэквивалентности.

В рамках исследования для изучаемых препаратов было проведено ФОФМ-исследование, в ходе которого на виртуальной популяции было показано, что риск получения результатов с недоказанной биоэквивалентностью высок и не рекомендуется применять исследованные серии препаратов для целей проведения исследований биоэквивалентности.

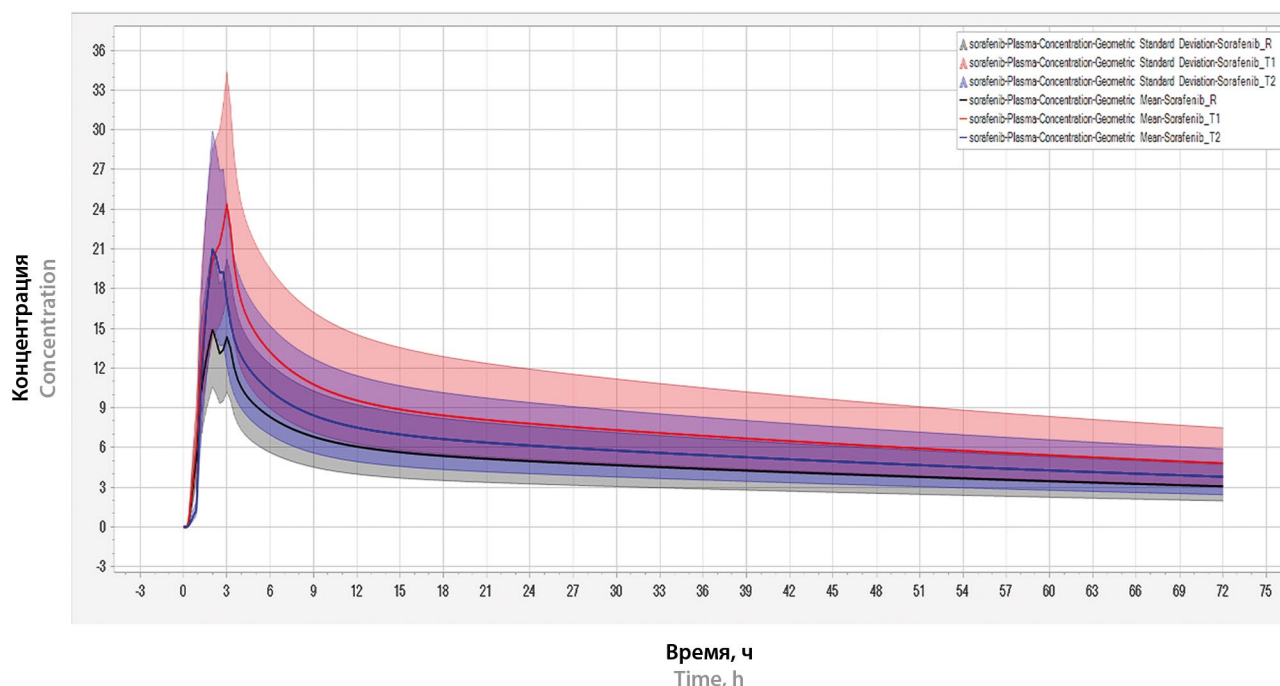


Рисунок 5. Смоделированный профиль «концентрация – время» для всех испытуемых препаратов. Сплошной линией отмечены среднегеометрические значения концентраций для каждого препарата, цветной областью отмечены стандартные отклонения для среднегеометрических значений концентраций для каждого препарата

Figure 5. Simulated concentration-time profile for all tested drugs. The solid line shows the geometric mean concentrations for each drug, and the colored area shows the standard deviations for the geometric mean concentrations for each drug

ЛИТЕРАТУРА

1. Раменская Г. В., Шохин И. Е., Кулинич Ю. И. Классификации лекарственных веществ по их биофармацевтическим свойствам – БКС и BDDCS. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2012;1:212–215.
2. Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;2:56–60.
3. Шохин И. Е., Багаева Н. С., Малашенко Е. А., Кузина В. Н. Методы оценки эквивалентности профилей растворения: современный взгляд (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):145–150. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-145-150.
4. Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I, Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D., Wichers H., editors. The Impact of Food Bioactives on Health. In vitro and ex vivo models. Cham (CH): Springer; 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-16104-4.
5. Hens B., Bermejo M., Tsume Y., Gonzalez-Alvarez I., Ruan H., Matsui K., Amidon G. E., Cavanagh K. L., Kuminek G., Benninghoff G., Fan J. H., Rodriguez-Hornedo N., Amidon G. L. Evaluation and optimized selection of supersaturating drug delivery systems of posaconazole (BCS class 2b) in the gastrointestinal simulator (GIS): An in vitro-in silico-in vivo approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;115:258–269.
6. Sarcevic I., Hens B., Tomaszewska I., McAllister M. Digitalizing the TIM-1 Model using Computational Approaches-Part One: TIM-1 Data Explorer. *Molecular Pharmaceutics*. 2023;20(11): 5416–5428. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00422.
7. Luo L., Thakral N. K., Schwabe R., Li L., Chen S. Using Tiny-TIM Dissolution and In Silico Simulation to Accelerate Oral Product Development of a BCS Class II Compound. *AAPS PharmSciTech*. 2022;23(6):185. DOI: 10.1208/s12249-022-02343-4.
8. Yska J. P., Punter R. J., Woerdenbag H. J., Emous M., Frijlink H. W., Wilffert B., van Roon E. N. A gastrointestinal simulation system for dissolution of oral solid dosage forms before and after Roux-en-Y gastric bypass. *European Journal of Hospital Pharmacy*. 2019;26(3):152–156. DOI: 10.1136/ejpharm-2017-001360.
9. Vrbanc H., Trontelj J., Berglez S., Petek B., Opara J., Jerreb R., Krajcar D., Legen I. The biorelevant simulation of gastric emptying and its impact on model drug dissolution and absorption kinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020;149:113–120. DOI: 10.1016/j.ejpb.2020.02.002.
10. Matsui K., Tsume Y., Searls A., Amidon G. L. Utilization of Gastrointestinal Simulator, an in Vivo Predictive Dissolution Methodology, Coupled with Computational Approach To Forecast Oral Absorption of Dipyridamole. *Molecular Pharmaceutics*. 2017;14(4):1181–1189. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01063.
11. Волкова Е. А., Медведев Ю. В., Фишер Е. Н., Шохин И. Е. Биовейвер как вид исследования биоэквивалентности. *Ведомости Научного центра экспертизы средств ме-*

дицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2024;14(1):42–52. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-537.

12. Гребенкин Д. Ю., Рябова А. В., Курамшина А. М., Кисляков И. В., Жукова Е. Д. Сравнительная оценка лекарственных препаратов с МНН «Каптоприл» различных производителей, представленных на рынке РФ, на основании исследований однородности дозирования и теста кинетики растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):131–141. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-131-141.
13. Мустафин Р. И., Ситенкова (Буховец) А. В., Фотаки Н. Особенности проведения предиктивного теста растворения (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;1(1):156–162.
14. Dressman J. Evolution of Dissolution Media Over the Last Twenty Years. *Dissolution Technologies*. 2014;21(3):6–10. DOI: 10.14227/DT210314P6.
15. Zoeller T., Klein S. Simplified Biorelevant Media for Screening Dissolution Performance of Poorly Soluble Drugs. *Dissolution Technologies*. 2007;14(4):8–13. DOI: 10.14227/DT140407P8.
16. Dahlgren D., Venczel M., Ridoux J.-P., Skjöld C., Müllertz A., Holm R., Augustijns P., Hellström P. M., Lennernäs H. Fasted and fed state human duodenal fluids: Characterization, drug solubility, and comparison to simulated fluids and with human bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2021;163:240–251. DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.04.005.
17. Jones H. M., Rowland-Yeo K. Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2013;2(8):e63. DOI: 10.1038/psp.2013.41.
18. Sager J. E., Yu J., Ragueneau-Majlessi I., Isoherranen N. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulation Approaches: A Systematic Review of Published Models, Applications, and Model Verification. *Drug Metabolism and Disposition*. 2015;43(11):1823–1837. DOI: 10.1124/dmd.115.065920.
19. Fisher J. W., Gearhart J. M., Lin Z., editors. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling. Methods and applications in toxicology and risk assessment. Amsterdam: Elsevier; 2020.
20. Yang S., Zhang B., Gong X., Wang T., Liu Y., Zhang N. In vivo biodistribution, biocompatibility, and efficacy of sorafenib-loaded lipid-based nanosuspensions evaluated experimentally in cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2016;11:2329–2343. DOI: 10.2147/IJN.S104119.
21. Song S., Wang C., Wang S., Siegel R. A., Sun C. C. Efficient development of sorafenib tablets with improved oral bioavailability enabled by coprecipitated amorphous solid dispersion. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;610:121216. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121216.
22. Choi I., Park S. Y., Lee S.-W., Kang Z., Jin Y. S., Kim I. W. Dissolution enhancement of sorafenib tosylate by co-milling with tetradecanol post-extracted using supercritical carbon dioxide. *Pharmazie*. 2020;75(1):13–17. DOI: 10.1691/ph.2020.9120.
23. Wiergowska G., Stasiłowicz A., Miklaszewski A., Lewandowska K., Cielecka-Piontek J. Structural Polymorphism of Sorafenib Tosylate as a Key Factor in Its Solubility Differentiation. *Pharmaceutics*. 2021;13(3):384. DOI: 10.3390/pharmaceutics13030384.

REFERENCES

1. Ramenskaya G. V., Shohin I. E., Kulinich Yu. I. Classification of medicinal substances according to their biopharmaceutical properties – BCS and BDDCS. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2012;1:212–215. (In Russ.)
2. Demina N. B. Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of drug formulations and their designs. *Drug development & registration*. 2017;2:56–60. (In Russ.)
3. Shohin I. E., Bagaeva N. S., Malashenko E. A., Kuzina V. N. Method of Estimating the Equivalence of Dissolution Profiles: a Modern View (Review). *Drug development & registration*. 2020;9(2):145–150. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-145-150.
4. Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I, Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D., Wichers H., editors. The Impact of Food Bioactives on Health. In vitro and ex vivo models. Cham (CH): Springer; 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-16104-4.
5. Hens B., Bermejo M., Tsume Y., Gonzalez-Alvarez I., Ruan H., Matsui K., Amidon G. E., Cavanagh K. L., Kuminek G., Benninghoff G., Fan J. H., Rodriguez-Hornedo N., Amidon G. L. Evaluation and optimized selection of supersaturating drug delivery systems of posaconazole (BCS class 2b) in the gastrointestinal simulator (GIS): An in vitro-in silico-in vivo approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;115:258–269.
6. Sarcevic I., Hens B., Tomaszewska I., McAllister M. Digitalizing the TIM-1 Model using Computational Approaches-Part One: TIM-1 Data Explorer. *Molecular Pharmaceutics*. 2023;20(11): 5416–5428. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00422.
7. Luo L., Thakral N. K., Schwabe R., Li L., Chen S. Using Tiny-TIM Dissolution and In Silico Simulation to Accelerate Oral Product Development of a BCS Class II Compound. *AAPS PharmSciTech*. 2022;23(6):185. DOI: 10.1208/s12249-022-02343-4.
8. Yska J. P., Punter R. J., Woerdenbag H. J., Emous M., Frijlink H. W., Wilffert B., van Roon E. N. A gastrointestinal simulation system for dissolution of oral solid dosage forms before and after Roux-en-Y gastric bypass. *European Journal of Hospital Pharmacy*. 2019;26(3):152–156. DOI: 10.1136/ejhp-2017-001360.
9. Vrbanc H., Trontelj J., Berglez S., Petek B., Opara J., Jerab R., Krajcar D., Legen I. The biorelevant simulation of gastric emptying and its impact on model drug dissolution and absorption kinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020;149:113–120. DOI: 10.1016/j.ejpb.2020.02.002.
10. Matsui K., Tsume Y., Takeuchi S., Searls A., Amidon G. L. Utilization of Gastrointestinal Simulator, an in Vivo Predictive Dissolution Methodology, Coupled with Computational Approach To Forecast Oral Absorption of Dipyrindamole. *Molecular Pharmaceutics*. 2017;14(4):1181–1189. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01063.
11. Volkova E. A., Medvedev Yu. V., Fisher E. N., Shohin I. E. Bio-waiver as a Bioequivalence Study Option. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(1):42–52. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2023-537

12. Grebenkin D.Yu., Ryabova A.V., Kuramshina A.M., Kislakov I.V., Zhukova E.D. Dissolution Profile Study and Uniformity of Dosage Units Test for Various Manufacturers of "Captopril" Drugs from the Russian Market. *Drug development & registration*. 2023;12(1):131–141. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-131-141.
13. Moustafine R.I., Sitenkova (Bukhovets) A.V., Fotaki N. The features of the predictive dissolution testing (review). *Drug development & registration*. 2017;(1):156–162. (In Russ.)
14. Dressman J. Evolution of Dissolution Media Over the Last Twenty Years. *Dissolution Technologies*. 2014;21(3):6–10. DOI: 10.14227/DT210314P6.
15. Zoeller T., Klein S. Simplified Biorelevant Media for Screening Dissolution Performance of Poorly Soluble Drugs. *Dissolution Technologies*. 2007;14(4):8–13. DOI: 10.14227/DT140407P8.
16. Dahlgren D., Venczel M., Ridoux J.-P., Skjöld C., Müllertz A., Holm R., Augustijns P., Hellström P. M., Lennernäs H. Fasted and fed state human duodenal fluids: Characterization, drug solubility, and comparison to simulated fluids and with human bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2021;163:240–251. DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.04.005.
17. Jones H. M., Rowland-Yeo K. Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2013;2(8):e63. DOI: 10.1038/psp.2013.41.
18. Sager J.E., Yu J., Ragueneau-Majlessi I., Isoherranen N. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulation Approaches: A Systematic Review of Published Models, Applications, and Model Verification. *Drug Metabolism and Disposition*. 2015;43(11):1823–1837. DOI: 10.1124/dmd.115.065920.
19. Fisher J.W., Gearhart J.M., Lin Z., editors. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling. Methods and applications in toxicology and risk assessment. Amsterdam: Elsevier; 2020.
20. Yang S., Zhang B., Gong X., Wang T., Liu Y., Zhang N. In vivo biodistribution, biocompatibility, and efficacy of sorafenib-loaded lipid-based nanosuspensions evaluated experimentally in cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2016;11:2329–2343. DOI: 10.2147/IJN.S104119.
21. Song S., Wang C., Wang S., Siegel R. A., Sun C. C. Efficient development of sorafenib tablets with improved oral bioavailability enabled by coprecipitated amorphous solid dispersion. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;610:121216. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121216.
22. Choi I., Park S.Y., Lee S.-W., Kang Z., Jin Y.S., Kim I.W. Dissolution enhancement of sorafenib tosylate by co-milling with tetradecanol post-extracted using supercritical carbon dioxide. *Pharmazie*. 2020;75(1):13–17. DOI: 10.1691/ph.2020.9120.
23. Wiergowska G., Stasiłowicz A., Miklaszewski A., Lewandowska K., Cielecka-Piontek J. Structural Polymorphism of Sorafenib Tosylate as a Key Factor in Its Solubility Differentiation. *Pharmaceutics*. 2021;13(3):384. DOI: 10.3390/pharmaceutics13030384.



Применение *in vitro* исследований для предсказания фармакокинетики таблеток ривароксабана

А. В. Суворова^{2✉}, П. А. Лосенкова^{1, 2}, Ю. В. Медведев^{1, 2}, Е. А. Малашенко^{1, 3},
К. К. Карнакова³, Н. С. Багаева³, А. Ю. Савченко⁴, А. М. Полуянов^{1, 2}, И. Е. Шохин³

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс» (ООО «СК»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8., помещ. 1/2

³ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ). 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

✉ Контактное лицо: Суворова Александра Вадимовна. E-mail: info@scientific-compliance.ru

ORCID: А. В. Суворова – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;
П. А. Лосенкова – <https://orcid.org/0009-0005-2391-5267>;
Ю. В. Медведев – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>;
Е. А. Малашенко – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>;
К. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-4010-1231>;
Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;
А. Ю. Савченко – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>;
А. М. Полуянов – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>;
И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 08.07.2024

Статья принята в печать: 26.08.2024

Статья опубликована: 27.08.2024

Резюме

Введение. Важнейшим этапом фармацевтической разработки воспроизведенного лекарственного средства (ЛС) является клиническое исследование с участием человека – исследование биоэквивалентности. Учитывая важность нахождения препаратов ривароксабана в перечне жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП), в рамках обеспечения технологического суверенитета требуется использование научных робастных и эффективных методов определения качества готовой лекарственной формы.

Цель. Провести исследование таблеток ривароксабана на физиологически релевантном тестере с целью предсказания фармакокинетических профилей.

Материалы и методы. Объектами исследования являются «Ксарелто[®], таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг» (серия ВХJS871, срок годности до 31.10.2024, Bayer AG, Германия), «Ксарелто[®], таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг» (серия ВХKDF32, срок годности до 17.05.2026, Bayer AG, Германия), «Ривароксабан, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг» и «Ривароксабан, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг» отечественного производства, с действующими сроками годности. Во время исследования использовались реактивы, необходимые для приготовления сред растворения и проведения количественного определения. Физиологически релевантный тест проводили на приборе СК ФРТ-6 (ООО «Сайнтифик Комплайнс», Россия). Определение количественного содержания высвободившегося ривароксабана в рамках теста сравнительной кинетики растворения (ТСКР) в среде 0,1%-го раствора натрия лаурилсульфата в фосфатном буферном растворе с pH 6,5 проводилось на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия). Количественное содержание высвободившегося ривароксабана в рамках ТСКР в биореlevantных средах растворения (БРС) и физиологически релевантного теста (ФРТ) оценивали на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия). Фармакокинетические профили были смоделированы в программе PK-Sim[®] (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Германия) на основании данных, полученных в рамках проведения ФРТ. Клиническое исследование таблеток ривароксабана представляло собой проспективное открытое рандомизированное перекрестное в двух этапах сравнительное исследование в двух группах добровольцев с однократным приемом препаратов натошак. В исследовании были рандомизированы 30 здоровых добровольцев мужского пола в возрасте 18–45 лет.

© Суворова А. В., Лосенкова П. А., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А., Карнакова К. К., Багаева Н. С., Савченко А. Ю., Полуянов А. М., Шохин И. Е., 2024

© Suvorova A. V., Losenkova P. A., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A., Karnakova K. K., Bagaeva N. S., Savchenko A. Yu., Poluyanov A. M., Shohin I. E., 2024

Результаты и обсуждение. Был проведен комплекс испытаний *in vitro*, получены профили, позволяющие оценить динамику и степень высвобождения исследуемых ЛС в различных отделах ЖКТ человека. Осуществлено сравнение последовательной и гибридной схем проведения ФРТ. По результатам проведения ФРТ по разным схемам были предсказаны фармакокинетические профили для пары препаратов и рассчитана ошибка прогнозирования.

Заключение. Проведен комплекс научных испытаний *in vitro* для препаратов «Ксарелто», таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг и 20 мг», «Ривароксабан, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг и 20 мг». В рамках сравнения данных, полученных при проведении клинического исследования и при моделировании наименьшая ошибка прогнозирования была отмечена при выполнении ФРТ по гибридной схеме.

Ключевые слова: ривароксабан, FaSSIF, FaSSGF, БКК

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

Вклад авторов. А. М. Полуянов, Е. А. Малашенко, А. Ю. Савченко и И. Е. Шохин придумали и разработали эксперимент. А. В. Суворова и П. А. Лосенкова провели ТСКР и ФРТ. Ю. В. Медведев проводил количественную оценку высвобождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и руководил работой. К. К. Карнакова и Н. С. Багаева проводили статистическую обработку данных. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Суворова А. В., Лосенкова П. А., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А., Карнакова К. К., Багаева Н. С., Савченко А. Ю., Полуянов А. М., Шохин И. Е. Применение *in vitro* исследований для предсказания фармакокинетики таблеток ривароксана. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):186–198. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1908>

Application of *in vitro* studies to predict the pharmacokinetics of rivaroxaban tablets

Alexandra V. Suvorova^{2✉}, Polina A. Losenkova^{1,2}, Yuri V. Medvedev^{1,2},
Eugenia A. Malashenko^{1,3}, Ksenia K. Karnakova³, Natalia S. Bagaeva³,
Alla Yu. Savchenko⁴, Andrey M. Poluyanov^{1,2}, Igor E. Shohin³

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

² Limited Liability Company "Scientific Compliance". 1/2, 8, Simferopolsky bulvar, Moscow, 117246, Russia

³ Limited Liability Company "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopolsky bulvar, Moscow, 117246, Russia

⁴ National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute). 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexandra V. Suvorova. **E-mail:** info@scientific-compliance.ru

ORCID: Alexandra V. Suvorova – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;
Polina A. Losenkova – <https://orcid.org/0009-0005-2391-5267>;
Yuri V. Medvedev – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>;
Eugenia A. Malashenko – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>;
Ksenia K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-4010-1231>;
Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;
Alla Yu. Savchenko – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>;
Andrey M. Poluyanov – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>;
Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 08.07.2024

Accepted: 26.08.2024

Published: 27.08.2024

Abstract

Introduction. The most important stage of pharmaceutical development of a generic drug is a clinical trial involving humans – a bioequivalence study. Considering the importance of finding rivaroxaban drugs in the list of vital and essential drugs, as part of ensuring technological sovereignty, the use of scientific robust and effective methods for determining the quality of the dosage form is required.

Aim. Conduct a study of rivaroxaban tablets on a physiologically relevant tester to predict pharmacokinetic profiles.

Materials and methods. The objects of the study are "Xarelto", film-coated tablets, 10 mg" (series BXJS871, with an expiration date of October 31, 2024, Bayer AG, Germany), "Xarelto", film-coated tablets, 20 mg" (series BXKDF32, with an expiration date of May 17, 2026, Bayer AG, Germany) and "Rivaroxaban, film-coated tablets, 10 mg" and "Rivaroxaban, film-coated tablets, 20 mg", domestically produced, with valid expiration dates. During the study, reagents were used to prepare dissolution media and perform quantitative determination. The physiologically relevant test was performed on the SC PRT-6 device (LLC "Scientific Compliance", Russia). The quantitative content of released rivaroxaban within the comparative dissolution kinetics test in a medium of 0.1 in a medium of 0.1 % sodium lauryl sulfate solution in a phosphate buffer solution pH 6.5 was carried out on a SF-2000 spectrophotometer (LLC "OKB Spektr", Russia). The quantitative content of released rivaroxaban within the comparative dissolution kinetics test in biorelevant dissolution media and physiological relevance test was assessed on a high-performance

liquid chromatograph "Chromatec-Crystal HPLC 2014" (CJSC "Chromatec", Russia). Pharmacokinetic profiles were modeled in the PK-Sim® (Systems Biology Software Suite 11.2, Bayer Technology Services GmbH, Germany) program based on the data obtained within the physiologically relevant test. The clinical study of rivaroxaban tablets was a prospective, open-label, randomized, crossover, two-stage comparative study in two groups of volunteers with a single dose of drugs on the fast condition. The study randomized 30 healthy male volunteers aged 18–45 years.

Results and discussion. A complex of *in vitro* tests was conducted, profiles were obtained that allow us to evaluate the dynamics and degree of release of the studied drugs in various parts of the human gastrointestinal tract. A comparison of the sequential and hybrid schemes for conducting the physiological relevance test was carried out. Within the framework of the set of tests, qualitative and quantitative correlation with the clinical trials data was observed only for the hybrid physiological relevance test scheme. Based on the results of physiological relevance test using different schemes, pharmacokinetic profiles for a pair of drugs were predicted and the prediction error was assessed.

Conclusion. A set of scientific *in vitro* tests was conducted for the drugs "Xarelto", film-coated tablets, 10 mg and 20 mg, "Rivaroxaban, film-coated tablets, 10 mg and 20 mg". Based on the physiological relevance test results, pharmacokinetic profiles for a pair of drugs were predicted with low error and high reliability. As part of the comparison of data obtained during clinical trial and modeling, the smallest prediction error was noted when performing physiological relevance test using a hybrid scheme.

Keywords: rivaroxaban, FaSSIF, FaSSGF, BCS

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. Andrey M. Poluyanov, Eugenia A. Malashenko, Alla Yu. Savchenko and Igor E. Shohin conceived and developed the experiment. Alexandra V. Suvorova and Polina A. Losenkova performed comparative dissolution kinetics test and physiological relevance test, Yuri V. Medvedev performed quantitative release assessment by high-performance liquid chromatography and supervised the work. Ksenia K. Karnakova and Natalia S. Bagaeva performed statistical processing of the data. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

For citation: Suvorova A. V., Losenkova P. A., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A., Karnakova K. K., Bagaeva N. S., Savchenko A. Yu., Poluyanov A. M., Shohin I. E. Application of *in vitro* studies to predict the pharmacokinetics of rivaroxaban tablets. *Drug development & registration*. 2024;13(3):186–198. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1908>

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим этапом фармацевтической разработки воспроизведенного ЛС является клиническое исследование с участием человека – исследование биоэквивалентности. В процессе фармацевтической разработки воспроизведенных ЛС происходит подбор условий производства, нарабатываются различные серии. Следующий этап – выбор серии для проведения исследования биоэквивалентности.

На этом этапе для предварительно отобранных серий необходимо проводить *in vitro* испытания. Самым простым экспериментом, который присутствует в нормативной документации на все твердые лекарственные формы, является тест растворения [1, 2]. Логическим продолжением этого испытания является ТСРП (тест сравнительной кинетики растворения) [3].

Существуют также подходы, в которых реализованы более сложные модели, например, тест в биореlevantных средах. [4] Но данные испытания не

являются обязательными, несмотря на их важность для проблемных препаратов, например относящихся к подклассу IIc биофармацевтической классификационной системы (БКС) [5, 6].

Типичным представителем II класса БКС являются препараты ривароксана, содержащие в качестве действующего вещества небольшую молекулу ($M = 436$ г/моль), практически нерастворимую в воде. С точки зрения фармакологии ривароксан является прямым ингибитором фактора Ха. Важность его применения была доказана, в частности, во время пандемии SARS-CoV-2 [7, 8].

Учитывая важность препарата при лечении ряда заболеваний, а также нахождение в перечне жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, в рамках обеспечения технологического суверенитета требуется использование научных робастных и эффективных методов определения качества готовой лекарственной формы, помимо обязательных, регуляторных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования являлись: «Ксарелто», таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг» (серия BXJS871, срок годности до 31.10.2024, Bayer AG, Германия), «Ксарелто», таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг» (серия BXKDF32, срок годности до 17.05.2026, Bayer AG, Германия), «Ривароксабан, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг» отечественного производства, с действующим сроком годности и «Ривароксабан, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг» отечественного производства, с действующим сроком годности.

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: вода очищенная, тип I; хлористоводородная кислота (HCl) концентрированная (класс «х.ч.», ООО «Сигма Тек», Россия); ортофосфорная кислота (H_3PO_4) концентрированная (класс «for HPLC», Scharlau, Испания); натрия гидроксид (NaOH) (класс «ч.д.а.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрий фосфорнокислый 2-замещенный (Na_2HPO_4), безводный (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия хлорид (NaCl) (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия лаурилсульфат (SDS) (класс «EP/USP», ООО «АЛЬДОСА», Россия), порошок для приготовления биорелевантных сред (БРС) SC Powder (ООО «Сайнтифик Комплайнс», Россия); ацетонитрил (ACN) (класс «HPLC gradient grade», Biosolve, Франция).

ТСКР проводили на тестере растворения Agilent 708-DS (Agilent Technologies, США). Физиологически релевантный тест (ФРТ) проводили на аппарате СК ФРТ-6 (ООО «Сайнтифик Комплайнс», Россия). Определение концентраций в ходе ТСКР в среде натрия лаурилсульфата проводили методом СФМ на приборе СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия). Хроматографическое разделение и оценку количественного содержания ривароксабана в рамках ТСКР в БРС и ФРТ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия) при длине волны 250 нм. Время хроматографирования составило 6 мин. Использовали колонку HPLC Column C18, 4,6 × 100 мм, 5 мкм (GL Sciences™ Inc., Япония), помещенную в колоночный термостат, поддерживающий температуру 35 °C на протяжении всего аналитического цикла. Режим элюирования – изократический (А:В – 55:45), в качестве подвижной фазы А выступал 0,2%-й раствор H_3PO_4 , фазы В – ацетонитрил.

Условия проведения ТСКР в среде растворения раствор SDS: аппарат «Лопастная мешалка» при скорости вращения 50 об/мин, 500 мл среды растворения, предварительно термостатированные при $37 \pm 0,5$ °C, временные точки отбора – 10, 15, 20, 30, 45, 60,

80, 100, 120, 180 мин. Среда растворения – 0,1%-й раствор натрия лаурилсульфата в фосфатном буферном растворе с pH 6,5.

Условия проведения БРС теста: аппарат «Лопастная мешалка» при скорости вращения 50 об/мин, 500 мл среды растворения, предварительно термостатированные при $37 \pm 0,5$ °C, временные точки отбора – 10, 15, 20, 30, 45, 60, 80, 100, 120, 180 мин, среда растворения – биорелевантная среда FaSSIF с pH 6,5. Методика приготовления: к 1000 мл воды очищенной добавляли 0,42 г NaOH, 3,95 г NaH_2PO_4 , 6,19 г NaCl, измеряли значение pH, в случае необходимости доводили значение pH до $6,5 \pm 0,05$ 0,1 М раствором HCl или 0,1 М раствором NaOH. В 500 мл полученного буферного раствора вносили 2,24 г порошка и тщательно перемешивали, а затем добавляли еще 500 мл буферного раствора.

Условия проведения ФРТ: последовательная схема – первый отдел содержал раствор биорелевантной среды растворения FaSSGF в количестве 50 мл и 250 мл воды очищенной (стакан воды, которым запивают таблетку), общий стартовый объем составлял 300 мл, а значение pH данного раствора – 2,84. Отдел, имитирующий желудок, опорожнялся по уравнению кинетики первого порядка, период полуопорожнения составил 18 мин, а время полного опорожнения (до объема 50 мл) – 38,6 мин. Методика приготовления FaSSGF: к 1000 мл раствора хлористоводородной кислоты добавляли 2,00 г NaCl и измеряли значение pH, в случае необходимости доводили значение pH до $2,0 \pm 0,05$ 0,1 М раствором HCl. К полученному раствору добавляли 0,060 г порошка для приготовления биорелевантных сред, перемешивали до полного растворения и использовали в течение 24 ч.

Второй отдел (12-перстная кишка) в начале теста заполнялся биорелевантной средой растворения FaSSIF со значением pH 6,5, стартовый объем в течение всего теста был постоянен и составлял 75 мл. Третий отдел (кишечник): стартовый объем был равен нулю, но к концу теста доходил до 390 мл. Точки отбора совпадали во всех стаканах, и отбор проб осуществлялся на 5, 10, 15, 20, 30, 35, 60 и 80-й минуте теста.

Гибридная схема – первый и третий отделы в начале теста пустые, для второго отдела в качестве содержимого было использовано 50 мл раствора биорелевантной среды растворения FaSSGF, к нему добавлялось 250 мл воды очищенной (стакан воды, которым запивают таблетку), общий стартовый объем составлял 300 мл. Этот отдел, имитирующий желудок натошак, опорожнялся в первый стакан по уравнению кинетики первого порядка в течение 40 мин, после чего в него начинал поступать секрет в виде биорелевантной среды растворения FaSSIF со значением pH 6,5. После 45-й мин теста в первый отдел переходил весь объем биорелевантной сре-

ды растворения FaSSGF, и он начинал имитировать желудок; второй и третий отделы после поступления во второй стакан секрета и перекачки среды из первого стакана в третий начинали имитировать 12-перстную кишку и кишечник соответственно. При этом осуществлялась постоянная секреция среды FaSSIF во второй отдел со скоростью 1 мл/мин и перекачка со скоростью 2 мл/мин из одного отдела в другой. Во время проведения теста точки отбора из разных отделов варьировались: так, из первого отдела проба отбиралась на 10, 20, 30, 40, 100 и 180-й минуте, из второго отдела – на 10, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 100, 120, 140, 160 и 180-й минуте, из третьего – на 60, 100, 120, 140, 160 и 180-й минуте.

В обоих тестах скорость лопастной мешалки составляла 25 об/мин, также был активен режим ускорения вращения, моделирующий реальную моторику желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в ходе которого каждые 5 мин осуществлялось ускорение лопастей до 180 об/мин, продолжавшееся в течение 15 с, после чего все возвращалось к первоначальным условиям.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ривароксабан относится к веществам II класса БКС, обладающим низкой растворимостью в воде и высокой проницаемостью [10]. При этом вещество относят к подклассу «с» (неоионизируемые вещества), что говорит о том, что на растворимость вещества не влияет pH на всем протяжении ЖКТ [11]. С учетом этих особенностей вещество требует внимательного подхода при фармацевтической разработке и оценке качества препарата.

Дизайн эксперимента был построен в обратном порядке, отличном от последовательного процесса фармацевтической разработки (рисунок 1): после получения неудовлетворительных результатов на клиническом этапе проводился комплекс испытаний *in vitro* для серий, которые были использованы в рамках клинического исследования с целью выявить дискриминативность существующих инструментов и оценить корреляцию с результатами клинической части исследования.

В ходе проведения доклинических испытаний для препарата проводился ТСКР в фармакопейных средах растворения согласно требованиям нормативной

документации, где были получены сопоставимые результаты для изучаемых препаратов. Поэтому в качестве пилотного эксперимента было проведено испытание в среде 0,1%-го раствора натрия лаурилсульфата в фосфатном буферном растворе с pH 6,5, так как она предварительно является более дискриминативной за счет наличия поверхностно-активных веществ (ПАВ). Полученные профили высвобождения приведены на рисунке 2

Анализ полученных данных показал качественные и количественные различия в высвобождении пары лекарственных препаратов. Но, учитывая специфику сред с добавлением анионных ПАВ, обусловленную низкой физиологичностью, было принято решение использовать биорелевантные среды растворения, обеспечивающие свойства, приближенные к условиям желудочно-кишечного тракта человека.

С учетом класса и подкласса БКС вещества была выбрана среда растворения FaSSIF (среда, имитирующая секрет кишечника натошак), содержащая ПАВ в количестве 2,24 г на 1 л раствора. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ-УФ, так как вещества, которые входят в состав порошка для приготовления биорелевантной среды растворения, поглощают в ультрафиолетовой области и могут иметь максимум, схожий с максимумом целевого анализа. Полученные результаты ТСКР в БРС для дозировки 20 мг представлены на рисунке 3.

Можно отметить, что результаты, полученные в условиях среды FaSSIF и SDS, различаются между собой, степень высвобождения референтного препарата понизилась в два раза, но при этом тестовый препарат стал высвобождаться лучше. Учитывая эти особенности, было принято решение применить ФРТ с целью максимального воссоздания условий желудочно-кишечного тракта человека *in vitro* и – ключевое – добавить фактор физиологического транзита между отделами.

Для испытания пары препаратов, помимо классической последовательной схемы (рисунок 4 А), была впервые использована гибридная схема проведения исследования (рисунок 4 Б).

Применение гибридной схемы оправданно в первую очередь для препаратов, относящихся к подклассу IIa БКС, что связано с низкой растворимостью в кислой среде (первый отдел ФРТ) и занижением степени перехода действующего вещества в последующие отделы в ходе теста. Помимо этого, данная

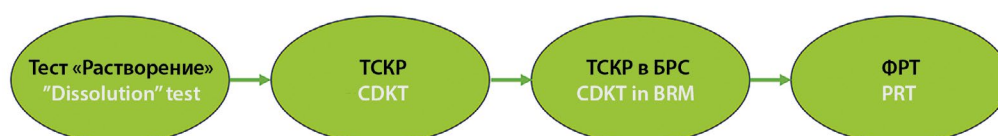


Рисунок 1. Этапы испытаний в фармацевтической разработке

Figure 1. The stages of tests in pharmaceutical development

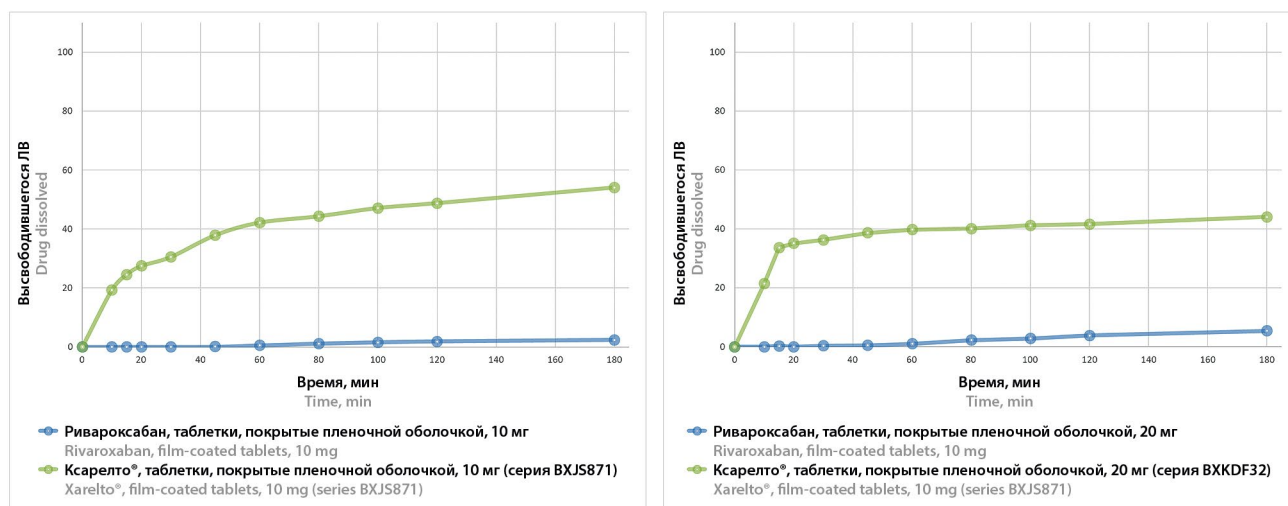


Рисунок 2. Результаты ТСКР в среде 0,1%-го раствора натрия лаурилсульфата в фосфатном буферном растворе с pH 6,5

Figure 2. Results of CDKT in a 0.1 % sodium lauryl sulfate solution in a phosphate buffer solution pH 6.5

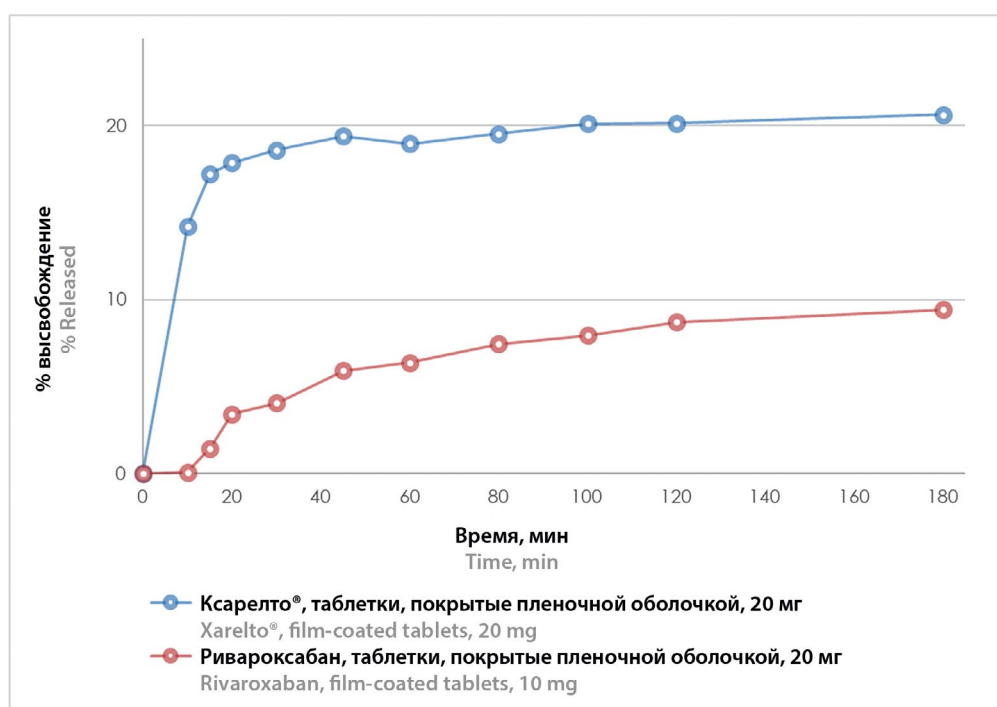


Рисунок 3. Результаты высвобождения ривароксабана в дозировке 20 мг при проведении ТСКР в БРС

Figure 3. Results of the release of rivaroxaban at a dosage of 20 mg during CDKT in the BRM

схема допустима для препаратов с низкой скоростью распадаемости лекарственной формы, что ведет к замедлению или отсутствию транзита, хотя в условиях ЖКТ человека транзит до последующих отделов не лимитируется. В рамках исследования ривароксабана применение гибридной схемы оправданно в силу низкой растворимости вне зависимости от pH.

Полученные профили высвобождения ривароксабана для референтного и испытуемого препаратов в дозировке 10 мг по гибридной схеме представлены на рисунках 5 и 6 соответственно, для дозировки 20 мг референтного и испытуемого препаратов профили высвобождения представлены на рисунках 7 и 8 соответственно.

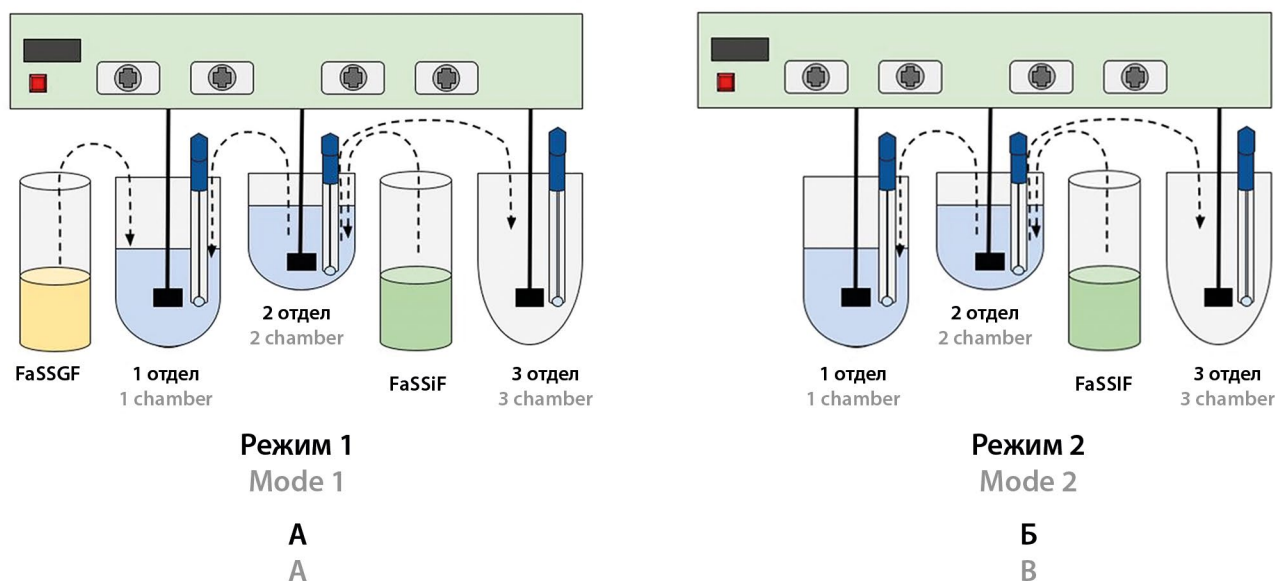


Рисунок 4. Режимы работы аппарата:

А – последовательная схема; Б – гибридная схема

Figure 4. Operation modes:

A – sequential scheme; B – hybrid scheme

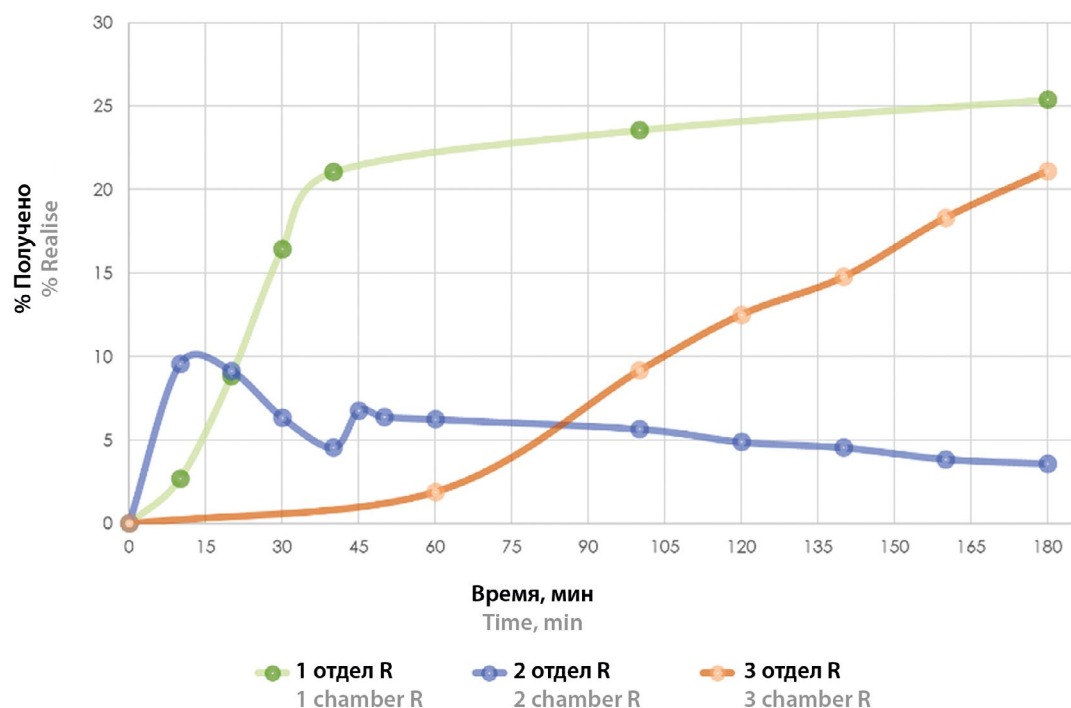


Рисунок 5. Усредненные профили растворения ривароксабана в лекарственном средстве «Ксарелто®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг» в трех отделах аппарата

Figure 5. Average dissolution profiles of rivaroxaban in "Xarelto® film-coated tablets, 10 mg" in three chambers of the apparatus

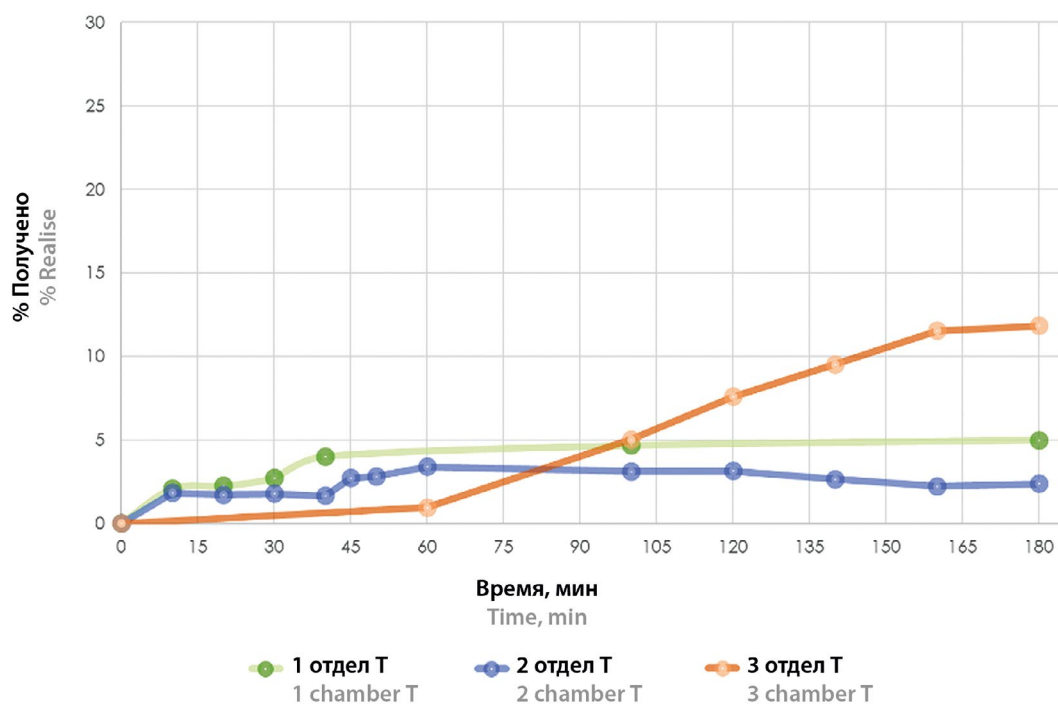


Рисунок 6. Усредненные профили растворения ривароксабана в лекарственном средстве «Ривароксабан, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг» в трех отделах аппарата

Figure 6. Average dissolution profiles of rivaroxaban in "Rivaroxaban, film-coated tablets, 10 mg" in three chambers of the apparatus

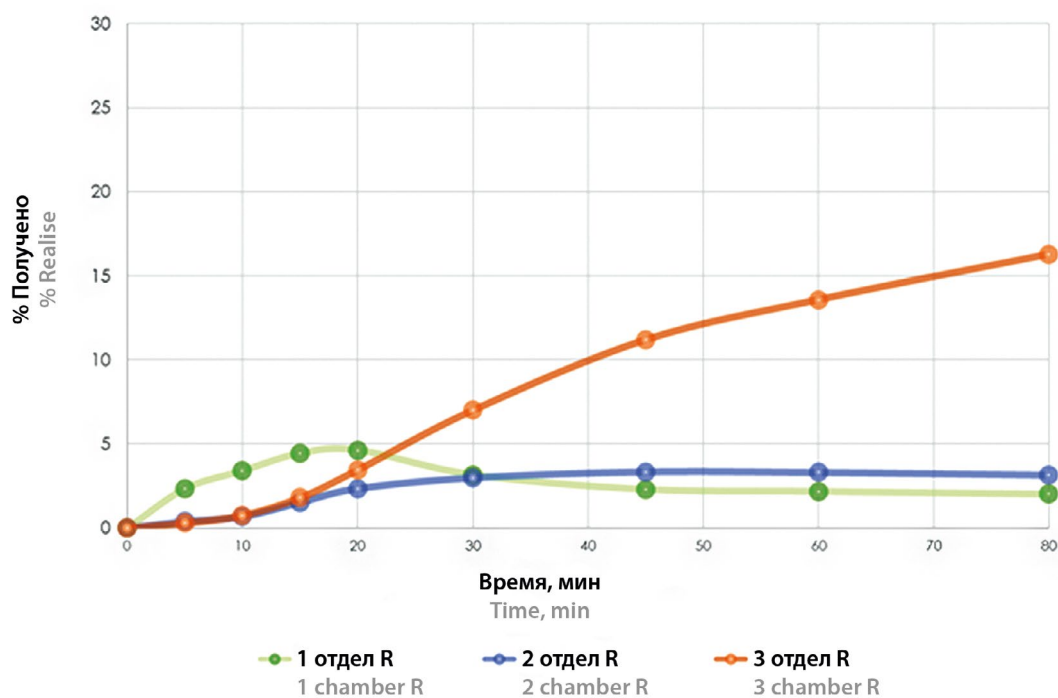


Рисунок 7. Усредненные профили растворения ривароксабана в лекарственном средстве «Ксарелто®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг» в трех отделах аппарата

Figure 7. Average dissolution profiles of rivaroxaban in "Xarelto® film-coated tablets, 20 mg" in three chambers of the apparatus

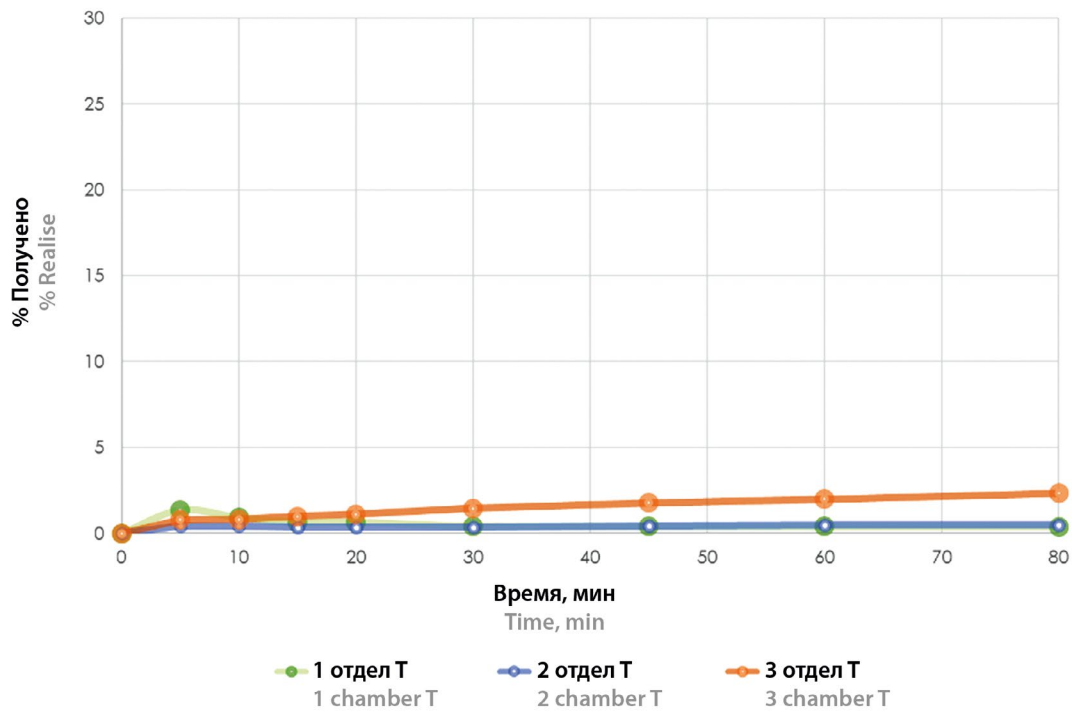


Рисунок 8. Усредненные профили растворения ривароксабана в лекарственном средстве «Ривароксабан, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг» в трех отделах аппарата

Figure 8. Average dissolution profiles of rivaroxaban in "Rivaroxaban, film-coated tablets, 20 mg" in three chambers of the apparatus

При использовании последовательной схемы можно отметить отсутствие транзита в последующие отделы для тестового препарата, по-видимому, из-за низкой распадаемости таблетки в первом отделе аппарата, имитирующем желудок. По результатам проведенного ФРТ по гибридной схеме были получены более показательные данные и предсказаны фармакокинетические профили, после чего сделано заключение о сопоставимости с клиническими исследованиями, которые проводились для изучаемых серий лекарственных препаратов.

При предсказании были использованы данные о молекуле ривароксабана, которые приведены в таблице 1.

Для симуляции фармакокинетических профилей была использована виртуальная популяция, состоящая из 30 добровольцев мужского пола, европеоидной расы, возрастом от 18 до 45 лет и индексом массы тела 18,5–29,9 кг/м², препарат принимался единожды натощак, забор крови проводился в течение 48 часов. В основу параметров виртуальной популяции легли данные добровольцев из проведенных клинических исследований.

Профили для лекарственных препаратов ривароксабана в дозировке 10 мг, которые были получены в рамках физиологически обоснованного фармакокинетического моделирования и при проведении

клинического исследования представлены на рисунках 9 и 10 соответственно. Для дозировки 20 мг смоделированные профили и профили, полученные в рамках клинического исследования представлены на рисунках 11 и 12.

Таблица 1. Параметры, использованные в ФОФМ

Table 1. Summary of parameters used in PBPK model

Параметр Parameter	Значение Value
Молярная масса MW	435,881 г/моль 435.881 g/mol
Липофильность Log P	1,74
Фракция препарата, несвязанная с компонентами плазмы fu	5 %
Константа диссоциации кислоты Константа диссоциации кислоты pKa	13,6
Растворимость при pH = 7,0 Dissolution at pH = 7,0	10,0 мкг/мл 10,0 ug/ml
Фермент, участвующий в метаболизме Metabolizing enzymes	CYP3A4, CYP2J2
Транспортный белок Transport protein	P-gp, BCRP

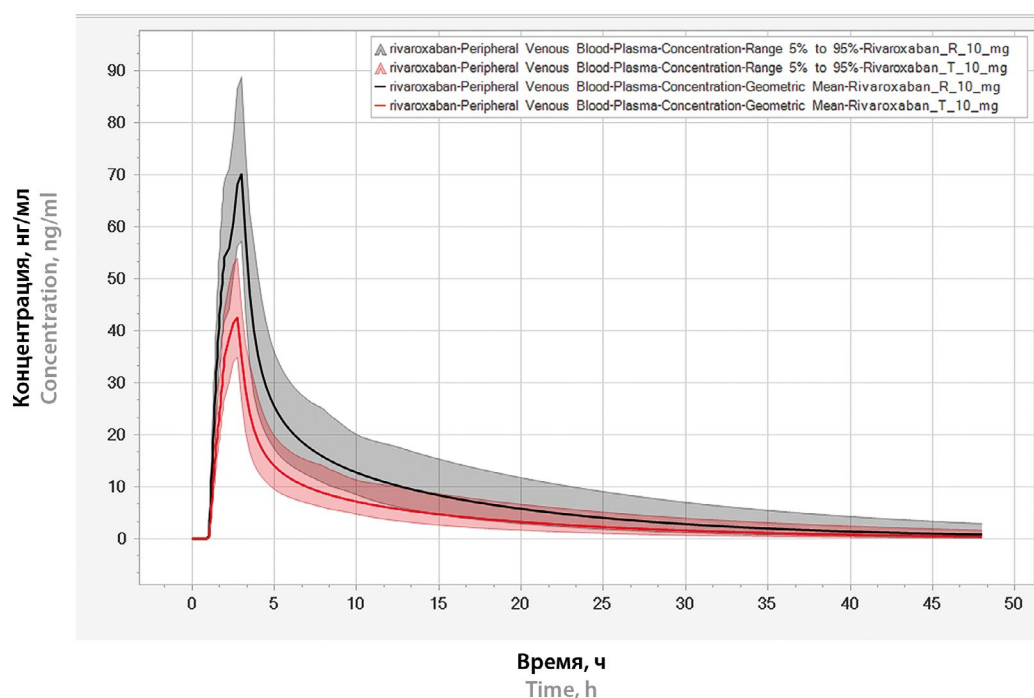


Рисунок 9. Фармакокинетические профили для исследуемого и референтного лекарственных препаратов в дозировке 10 мг, предсказанные ФОФМ

Figure 9. Pharmacokinetic profiles test and reference drugs predicted by PBPK for dose 10 mg

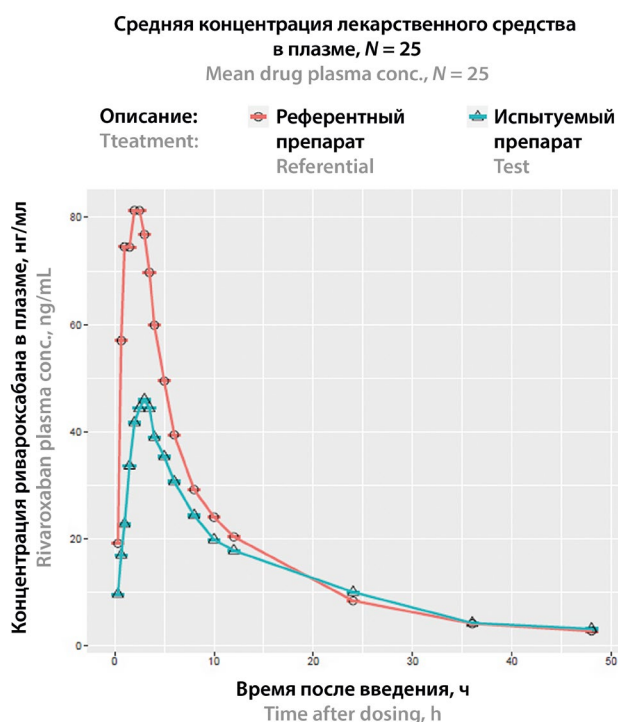


Рисунок 10. Фармакокинетические профили для исследуемого и референтного лекарственных препаратов в дозировке 10 мг, полученные в ходе клинического исследования

Figure 10. Pharmacokinetic profiles test and reference drugs obtained during the clinical trial for dose 10 mg

На представленных выше рисунках расположение профилей испытуемого и референтного препаратов относительно друг друга совпадает между смоделированными данными и данными полученными при проведении клинического исследования. Аналогичное расположение профилей относительно друг друга сохраняется и в рамках ФОФМ для разных дозировок препарата ривароксабана (10 и 20 мг), несмотря на различие в схемах проведения физиологически релевантного теста. Однако, различия между испытуемым и референтным препаратами не достоверны при проведении испытания по классической последовательной схеме: предсказанный фармакокинетический профиль испытуемого препарата сильно занижен относительно профиля, полученного на клиническом этапе для этого же препарата.

Для оценки меры различия между смоделированными данными и данными из клинического исследования были рассчитаны отношения среднегеометрических значений фармакокинетических параметров исследуемого лекарственного препарата по отношению к референтному препарату. На основании полученного значения была вычислена погрешность прогнозирования, полученные результаты приведены в таблице 2.

Из-за полученных в ходе предсказания данных для испытуемого препарата для дозировки 20 мг погрешность предсказания по отношению к данным клинического исследования столь высока:

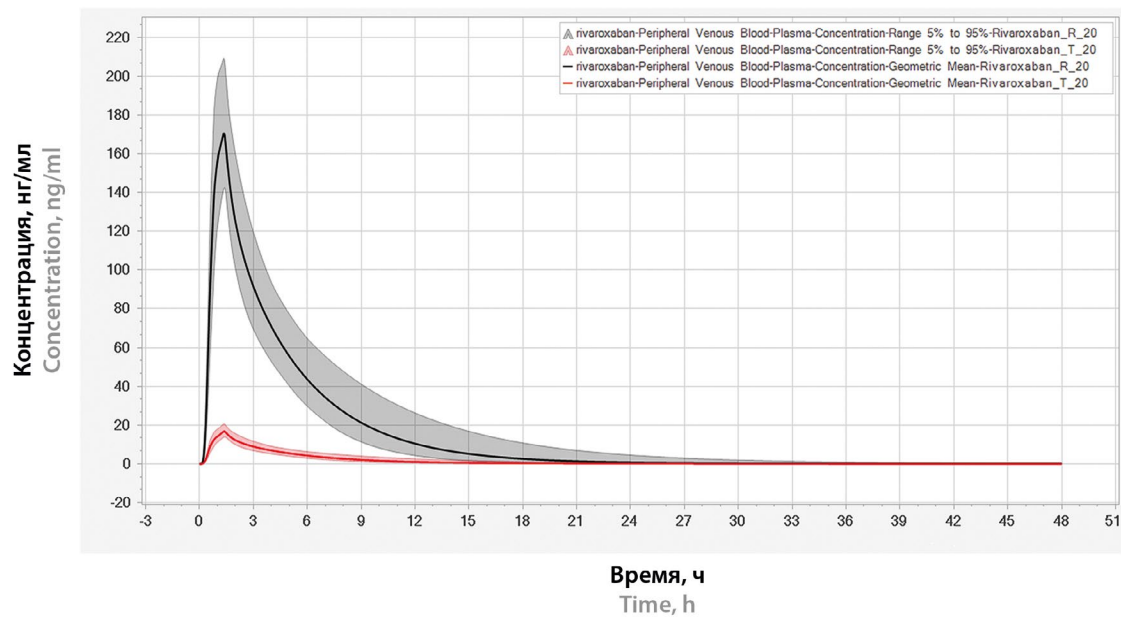


Рисунок 11. Фармакокинетические профили для исследуемого и референтного лекарственных препаратов в дозировке 20 мг, предсказанные ФОФМ

Figure 11. Pharmacokinetic profiles test and reference drugs predicted by PBPK for dose 20 mg

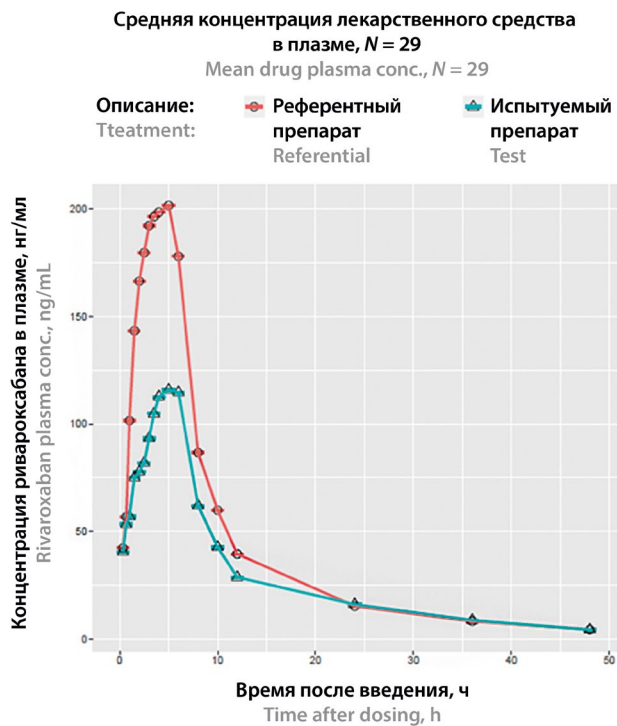


Рисунок 12. Фармакокинетические профили для исследуемого и референтного лекарственных препаратов в дозировке 20 мг, полученные в ходе клинического исследования.

Figure 12. Pharmacokinetic profiles test and reference drugs obtained during the clinical trial for dose 20 mg

$AUC_{0-t} = -14,83\%$ и $C_{max} = -551,72\%$, что можно сделать вывод – классическая последовательная схема проведения ФРТ не оптимальна для испытуемого препарата.

Таблица 2. Значения отношений среднегеометрических значений фармакокинетических параметров исследуемого лекарственного препарата к референтному лекарственному препарату

Table 2. Values of the ratio of the geometric mean values of the pharmacokinetic parameters of the studied drug to the reference drug

Параметр Parameter	Данные, полученные при проведении клинических исследований Data from clinical trials	Данные, полученные в рамках симуляции Data from the simulation	Погрешность прогнозирования для отношений геометрических средних T/R, % Prediction error (PE) for geometric mean ratio T/R, %
Данные для дозировки 10 мг Data for dose 10 mg			
AUC_{0-t}	77,95	56,63	-37,64
C_{max}	51,68	59,21	12,71
Данные для дозировки 20 мг Data for dose 20 mg			
AUC_{0-t}	69,43	9,71	-614,83
C_{max}	64,12	9,84	-551,72

При этом для дозировки 10 мг погрешность предсказания параметра $C_{\max}$ близка к 10 %, что является более корректным результатом (при проведении IVIVC к моделям предъявляется требование погрешность не более 10 %). Для параметра AUC_{0-t} наблюдается низкая точность предсказания, что в свою очередь может быть связано с несколькими факторами:

1. При моделировании, временной интервал между точками построения на всех участках профиля одинаков, в то время как профили, полученные при проведении клинических исследований, строятся по точкам с разными временными интервалами, что сказывается на форме профиля на фазе элиминации.
2. При анализе фармакокинетических профилей от добровольцев были отмечены случаи нетипичной формы, но в рамках предсказанных профилей, полученных при проведении *in vitro* теста подобные случаи не встречались

Результаты эксперимента открывают новые пути совершенствования проведения *in vitro* испытаний и проведения ФОФМ с целью предсказания результатов фармакокинетических исследований с высокой степенью достоверности оценки прогнозирования. При этом стоит отметить важность индивидуального научного подхода к методике проведения испытаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен комплекс *in vitro* испытаний ФРТ для препаратов Ксарелто® и «Ривароксабан». Количественное определение осуществлялось валидированными методами СФМ и ВЭЖХ-УФ.

В процессе проведения исследований лекарственных препаратов отечественного производства «Ривароксабан, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг и 20 мг» был проведен ТСКР в среде, содержащей раствор SDS, в результате которого было показано крайне низкое высвобождение и неэквивалентность референсному препарату «Ксарелто®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг и 20 мг». В целях дальнейшего прогнозирования поведения ЛП «Ривароксабан, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг и 20 мг» и «Ксарелто®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг и 20 мг» было проведено ФРТ-исследование, результаты которого легли в основу ФОФМ-исследования. Результаты моделирования были сопоставлены с результатами фармакокинетики исследуемых препаратов и рассчитана ошибка прогнозирования для отношения среднегеометрических значений фармакокинетических параметров. Для дозировки 20 мг она составила 614,83 % для AUC_{0-t} и – 551,72 % для $C_{\max}$; для дозировки 10 мг она составила 37,64 % для AUC_{0-t} и 12,71 % для $C_{\max}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дружининская О. В., Смехова И. Е. Применение теста «Растворение» для оценки фармацевтической эквивалентности дженериков аторвастатина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(1):166–172.
2. Давыдова К. С., Кулинич Ю. И., Шохин И. Е. Тест «Растворение» в контроле качества лекарственных средств. *Ремедиум*. 2010;(5):42.
3. Смехова И. Е., Перова Ю. М., Кондратьева И. А., Родыгина А. Н., Турецкова Н. Н. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2013;(12):50–61.
4. Dressman J. Evolution of Dissolution Media Over the Last Twenty Years. *Dissolution Technologies*. 2014;(21):6–10. DOI: 10.14227/DT210314P6.
5. Дружининская О. В., Смехова И. Е. Среды растворения, применяемые в разработке и контроле качества лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):144–150.
6. Naing M. D., Tsume Y. Dissolution profiles of BCS class II drugs generated by the gastrointestinal simulator alpha has an edge over the compendial USP II method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024;203: 114436. DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114436.
7. Ramacciotti E., Agati L. B., Calderaro D., Resende Aguiar V. C., Spyropoulos A. C., Carvalho de Oliveira C. C., Lins dos Santos J., Volpiani G. G., Sobreira M. L., Joviliano E. E., Bohatch Júnior M. S., Lopes da Fonseca B. A., Ribeiro M. S., Dusilek C., Itinose K., Viana Sanches S. M., de Almeida Araujo Ramos K., Franzin de Moraes N., Guimarães Morando Marzocchi Tierno P. F., Malavasi Longo de Oliveira A. L., Tachibana A., Caruso Chate R., Vinícius Barbosa Santos M., Bezerra de Menezes Cavalcante B., Cesar Rocha Moreira R., Chang C., Tafur A., Fareed J., Lopes R. D., Benvenuto Caltabiano T., Hattori B., da Silva Jardim M., Marinho I., Marinho I. S., Melo Batista L. M., Rivabem L., Kenji Nakashima C. A., Gois Franco A. C., de Oliveira Pereira R. F., Strack Neves G. C., de Castro e Souza I., Moraes Ribas B., Ramos Tristão F., Vinicius Barbosa Santos M. Rivaroxaban versus no anticoagulation for post-discharge thromboprophylaxis after hospitalisation for COVID-19 (MICHELLE): an open-label, multicentre, randomised, controlled trial. *The Lancet*. 2022;399(10319):50–59. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02392-8.
8. Kumar D., Kaimaparambil V., Chandralekha S., Lalchandani J. Oral Rivaroxaban in the Prophylaxis of COVID-19 Induced Coagulopathy. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2022;70(2):11–12.
9. Kushwah V., Arora S., Katona M. T., Modhave D., Fröhlich E., Paudel A. On Absorption Modeling and Food Effect Prediction of Rivaroxaban, a BCS II Drug Orally Administered as an Immediate-Release Tablet. *Pharmaceutics*. 2021;13(2):283. DOI: 10.3390/pharmaceutics13020283.
10. Takács-Novák K., Szőke V., Völgyi G., Horváth P., Ambrus R., Szabó-Révész P. Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;83:279–285. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.05.011.

11. García M. A., Cristofolletti R., Abrahamsson B., Groot D. W., Parr A., Polli J. E., Mehta M., Shah V. P., Tomakazu T., Dressman J. B., Langguth P. Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Carbamazepine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;110(5):1935–1947. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.02.019.

REFERENCES

1. Druzhininskaya O. V., Smekhova I. E. Use of dissolution test for evaluation of pharmaceutical equivalence of atorvastatin generics. *Drug development & registration*. 2018;(1):166–172. (In Russ.)
2. Davydova K. S., Kulinich Yu. I., Shokhin I. E. Test "Dissolution" in quality control of medicines. *Remedium*. 2010;(5):42. (In Russ.)
3. Smekhova I. E., Perova Yu. M., Kondratyeva I. A., Rodygina A. N., Turetskova N. N. "Dissolution" test and modern approaches to assessing drug equivalence vein drugs. *Drug development & registration*. 2013;1(2):50–61. (In Russ.)
4. Dressman J. Evolution of Dissolution Media Over the Last Twenty Years. *Dissolution Technologies*. 2014;(21):6–10. DOI: 10.14227/DT210314P6.
5. Druzhininskaya O. V., Smekhova I. E. Dissolution media used in development and quality control of drugs. *Drug development & registration*. 2017;(3):144–150. (In Russ.)
6. Naing M. D., Tsume Y. Dissolution profiles of BCS class II drugs generated by the gastrointestinal simulator alpha has an edge over the compendial USP II method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024;203:114436. DOI: 10.1016/j.ejpb.2024.114436.
7. Ramacciotti E., Agati L. B., Calderaro D., Resende Aguiar V. C., Spyropoulos A. C., Carvalho de Oliveira C. C., Lins dos Santos J., Volpiani G. G., Sobreira M. L., Joviliano E. E., Bohatch Júnior M. S., Lopes da Fonseca B. A., Ribeiro M. S., Dusilek C., Itinose K., Viana Sanches S. M., de Almeida Araujo Ramos K., Franzin de Moraes N., Guimarães Morando Marzocchi Tierno P. F., Malavasi Longo de Oliveira A. L., Tachibana A., Caruso Chate R., Vinícius Barbosa Santos M., Bezerra de Menezes Cavalcante B., Cesar Rocha Moreira R., Chang C., Tafur A., Fareed J., Lopes R. D., Benevenuto Caltabiano T., Hattori B., da Silva Jardim M., Marinho I., Marinho I. S., Melo Batista L. M., Rivabem L., Kenji Nakashima C. A., Gois Franco A. C., de Oliveira Pereira R. F., Strack Neves G. C., de Castro e Souza I., Moraes Ribas B., Ramos Tristão F., Vinicius Barbosa Santos M. Rivaroxaban versus no anticoagulation for post-discharge thromboprophylaxis after hospitalisation for COVID-19 (MICHELLE): an open-label, multicentre, randomised, controlled trial. *The Lancet*. 2022;399(10319):50–59. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02392-8.
8. Kumar D., Kaimaparambil V., Chandralekha S., Lalchandani J. Oral Rivaroxaban in the Prophylaxis of COVID-19 Induced Coagulopathy. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2022;70(2):11–12.
9. Kushwah V., Arora S., Katona M. T. Modhave D. Fröhlich E. Paudel A. On Absorption Modeling and Food Effect Prediction of Rivaroxaban, a BCS II Drug Orally Administered as an Immediate-Release Tablet. *Pharmaceutics*. 2021;13(2):283. DOI: 10.3390/pharmaceutics13020283.
10. Takács-Novák K., Szőke V., Völgyi G., Horváth P., Ambrus R., Szabó-Révész P. Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;83:279–285. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.05.011.
11. García M. A., Cristofolletti R., Abrahamsson B., Groot D. W., Parr A., Polli J. E., Mehta M., Shah V. P., Tomakazu T., Dressman J. B., Langguth P. Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Carbamazepine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;110(5):1935–1947. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.02.019.



Количественное определение феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различных процедурах экстракции

И. И. Мирошниченко¹✉, А. И. Платова¹, И. И. Кузьмин¹, Д. В. Иващенко²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр психического здоровья» (ФГБНУ НЦПЗ). 115522, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 34

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 125993, Россия, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

✉ Контактное лицо: Мирошниченко Игорь Иванович. E-mail: igormir41@gmail.com

ORCID: И. И. Мирошниченко – <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>;

А. И. Платова – <https://orcid.org/0000-0002-9682-4623>;

И. И. Кузьмин – <https://orcid.org/0000-0002-9326-4683>;

Д. В. Иващенко – <https://orcid.org/0000-0002-2295-7167>.

Статья поступила: 06.10.2024

Статья принята в печать: 20.08.2024

Статья опубликована: 23.08.2024

Резюме

Введение. Наличие активного метаболита 3-гидроксифеназепама (3-ОН-ФЕН), широкая межиндивидуальная вариабельность активной фракции феназепама (ФЕН) в крови, а также его терапевтического эффекта определяют актуальность терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ). Для этого исследователь должен располагать экспрессной методикой с широким аналитическим диапазоном, низким пределом количественного определения (НПКО), робастной при разных методах пробоподготовки.

Цель. Разработка и валидация методик количественного определения ФЕН и 3-гидроксифеназепама для измерения содержания этих аналитов в плазме крови человека при разных методах экстракции.

Материалы и методы. Определение ФЕН и 3-ОН-ФЕН в плазме крови человека проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Для пробоподготовки использовали твердофазную экстракцию (SPE, от *англ.* «solid phase extraction») и жидкостную экстракцию с поддержкой (SLE, от *англ.* «supported liquid extraction»), иначе называемую жидкостно-жидкостной экстракцией на твердой фазе. Внутренний стандарт (ВС) – метопролол. Подвижная фаза: 0,2%-й водный раствор муравьиной кислоты (элюент А) и 100%-й ацетонитрил (элюент В); режим: градиентный. Колонка: Hypersil GOLD® C18, 50 × 2,1 мм, 3,5 мкм.

Результаты и обсуждение. Разработаны две методики количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН в плазме крови человека при разных методах пробоподготовки: SPE и SLE. Подобраны условия хроматографического разделения и масс-спектрометрической детекции изучаемых аналитов. Для обеих методик были определены следующие валидационные характеристики: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень экстракции, НПКО, эффект переноса, фактор матрицы, стабильность рабочих растворов и аналита в матрице.

Заключение. Результаты валидации разработанных методик соответствуют установленным критериям, что позволяет их использовать для количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН в плазме крови человека. Широкий аналитический диапазон обеих методик – 1–1000,00 нг/мл – позволяет применять их для проведения исследований фармакокинетики и биоэквивалентности, а также в токсикологии.

Ключевые слова: феназепам, 3-гидроксифеназепам, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, твердофазная экстракция, жидкостная экстракция с поддержкой

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

Вклад авторов. И. И. Мирошниченко, Д. В. Иващенко – постановка цели и задач исследования, формирование структуры статьи. А. И. Платова – контроль качества аналитических работ, валидация методики. И. И. Кузьмин – измерение концентрации изучаемых аналитов.

Для цитирования: Мирошниченко И. И., Платова А. И., Кузьмин И. И., Иващенко Д. В. Количественное определение феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различных процедурах экстракции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):199–207. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1609>

Quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at different extraction procedures

Igor I. Miroshnichenko¹✉, Angelina I. Platova¹, Ivan I. Kuzmin¹, Dmitriy V. Ivaschenko²

¹ Federal state budgetary scientific institution "Mental health research center". 34, Kashirskoe shosse, Moscow, 115522, Russia

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. Building 1, 2/1, Barrikadnaya str., Moscow, 125993, Russia

✉ **Corresponding author:** Igor I. Miroshnichenko. **E-mail:** igormir41@gmail.com

ORCID: Igor I. Miroshnichenko – <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>;

Angelina I. Platova – <https://orcid.org/0000-0002-9682-4623>;

Ivan I. Kuzmin – <https://orcid.org/0000-0002-9326-4683>;

Dmitriy V. Ivaschenko – <https://orcid.org/0000-0002-2295-7167>.

Received: 06.10.2024

Accepted: 20.08.2024

Published: 23.08.2024

Abstract

Introduction. The presence of the active metabolite (3-hydroxyphenazepam, 3-OH-PHEN), the wide interindividual variability of the therapeutic effect of phenazepam (PHEN), as well as its active moiety in the blood, determine the relevance of therapeutic drug monitoring (TDM). To do this, the researcher must have an express analytical technique with a wide analytical range, a low limit of quantification (LLOQ), and with robustness with different sample preparation methods.

Aim. Development and validation of quantitative methods for PHEN and 3-OH-PHEN in human blood plasma with different sample preparation methods.

Materials and methods. The determination of PHEN and 3-OH-PHEN has been performed by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Solid-phase extraction (SPE) and liquid extraction with support (SLE) otherwise called liquid-liquid extraction in the solid phase were used for sample preparation. Metoprolol was utilized as an internal standard (IS). Gradient elution profile between mobile phase A (0.2 % aqueous formic acid) and B (100 % acetonitrile) has been used. Column: Hypersil GOLD® C18, 50 × 2.1 mm, 3.5 μm.

Results and discussion. Two methods have been developed for the quantitative determination of PHEN and 3-OH-PHEN in human blood plasma using different sample preparation methods: SPE and SLE. The conditions of chromatographic separation and mass spectrometric detection of the analytes are selected. The following validation characteristics were determined for both methods: selectivity, calibration curve, accuracy, precision, degree of extraction, LLOQ, carry-over effect, matrix factor, stability of standard solutions and analyte in the matrix.

Conclusion. The validation results of the developed methods meet the established criteria, which allows them to be used for the quantitative determination of PHEN and 3-OH-PHEN in human blood plasma. The wide analytical range for both methods 1–1000.00 ng/ml allows the use them for pharmacokinetics and bioequivalence studies, as well as in toxicology.

Keywords: phenazepam, 3-oxyphenazepam, HPLC-MS/MS, validation, solid phase extraction, supported liquid extraction

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. Igor I. Miroshnichenko and Dmitriy V. Ivaschenko are responsible for the statement of the problem, the purpose of the study and general general articles. Angelina I. Platova carried out quality control and validation procedures. Ivan I. Kuzmin measured the concentration of the analytes under study.

For citation: Miroshnichenko I. I., Platova A. I., Kuzmin I. I., Ivaschenko D. V. Quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at different extraction procedures. *Drug development & registration*. 2024;13(3):199–207. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1609>

ВВЕДЕНИЕ

Феназепам (бромдигидрохлорфенилбензодиазепин, 7-бром-5-(2-хлорфенил)-1,3-дигидро-2Н-1,4-бензодиазепин-2-он) – производное бензодиазепина, структурно сходное с флуромазепамом, в котором хлор заменен на фтор в фенильной группе Moosmann [1]. Этот транквилизатор впервые синтезировали в 1974 г. в результате совместной разработки

НИИ фармакологии им. В. В. Закусова и Одесского физико-химического института им. А. В. Богатского АН СССР [2–4].

ФЕН относится к высокопотентным бензодиазепинам. Обладая успокоительным, седативным, противосудорожным и миорелаксирующим свойствами, этот препарат успешно применяется для купирования синдрома отмены алкоголя [5].

К сожалению, помимо мощного и быстрого фармакотерапевтического действия, ФЕН вызывает формирование лекарственной зависимости [6]. Особую опасность представляет прием препарата водителями автотранспорта [7, 8]. В РФ с 22.03.2021 ФЕН включен в раздел II номенклатуры сильнодействующих и ядовитых веществ, не являющихся прекурсорами наркотических средств и психотропных веществ.

ФЕН, подобно другим 1,4-бензодиазепинам, интенсивно метаболизируется, и только небольшая доля полученной дозы выводится в неизмененном виде. Основным активный метаболит 3-ОН-ФЕН, кроме того, является основным действующим веществом препарата «Левана» (МНН: циназепам) [9] (рисунок 1).

На интенсивность метаболизма ФЕН может влиять комедикация с препаратами – ингибиторами или индукторами цитохрома 3A4/5, что сказывается на концентрациях 3-ОН-ФЕН и ФЕН в крови [10]. Наличие у 3-ОН-ФЕН фармакологической активности означает необходимость измерения его уровня наряду с основным веществом. Широкая фармакокинетическая вариабельность ФЕН и 3-ОН-ФЕН требует изучения и проведения ТЛМ. При приеме ФЕН в клинической дозе 0,5–2,0 мг максимальные концентрации в плазме крови варьируют от 20 до 60 нг/мл (терапевтический диапазон), а при злоупотреблении ФЕН они могут более чем в 50 раз превышать этот уровень. Так, по данным анализа судебно-медицинских образцов крови водителей, задержанных за вождение в нетрезвом виде в США, Великобритании и Финляндии, измеренные уровни ФЕН варьировали в диапазоне 50–5000 нг/мл. А уровень ФЕН в крови пациентов с наркотической зависимостью ($n = 20$) в Финляндии составил 18–4000 нг/мл [11]. Поэтому для возможности применения в широких целях методика количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН, помимо экспрессности и простой техники пробоподготовки, должна также иметь как можно более широкий аналитический диапазон.

Ранее для количественного определения ФЕН была разработана и применена методика ВЭЖХ с УФ-детекцией и газовой хроматографией с детектором электронного захвата [12]. Аналитический диа-

пазон в этой работе был узким, составляя 50–150 для ФЕН и 80–200 нг/мл для 3-ОН-ФЕН, а двухэтапная экстракция не обеспечивала должную экспрессность. В другой работе НПКО этой методики был снижен до 1 и 3 нг/мл для ФЕН и 3-ОН-ФЕН соответственно [13]. Методика S. Kerrigan и соавт. (2013) также подразумевала газовую хромато-масс-спектрометрию, ограничивалась количественным определением ФЕН без метаболита и имела аналитический диапазон 1–100 нг/мл [7]. По-видимому, термолабильность молекул ФЕН и 3-ОН-ФЕН существенно ограничивает возможности газовой хроматографии в их количественном определении.

Альтернативой хроматографическим подходам может выступать иммуноанализ (ИФА), однако он имеет существенные ограничения из-за перекрестной интерференции, методика L. C. O'Connor и соавт. (2016) не включала метаболит ФЕН и ограничивалась аналитическим диапазоном 5–300 нг/мл [14]. В настоящее время все большую популярность в биоаналитике бензодиазепиновых производных приобретает ВЭЖХ-МС/МС, в работе R. A. Mastrovito и соавт. (2021) приведена методика количественного определения 12 бензодиазепинов, которая включала ФЕН (аналитический диапазон 1,88–200 нг/мл), но не его метаболит [15]. Chu-An Yang и соавт. (2022) была разработана методика ВЭЖХ-МС/МС для одновременного измерения ФЕН и этизолама, которая также не включала 3-ОН-ФЕН [16]. В другой публикации приведены сведения по методике одновременного измерения в крови 13 дизайнерских бензодиазепинов, включая 3-ОН-ФЕН (аналитический диапазон 1–500 нг/мл), однако данная работа не включала собственно ФЕН [17]. Представляет интерес методика M. P. Pettersson и соавт. (2016) для количественного определения 28 дизайнерских бензодиазепинов в моче, в том числе ФЕН и 3-ОН-ФЕН (аналитический диапазон 5–1000 нг/мл), с применением метода масс-спектрометрии высокого разрешения [18].

M. L. Crichton и соавт. [19] проводили количественное определение ФЕН и 3-ОН-ФЕН в посмертных жидкостях и тканях с помощью ВЭЖХ-МС/МС, в работе подробно не представлены условия пробоподготовки, калибровочный диапазон для ФЕН (0,7–

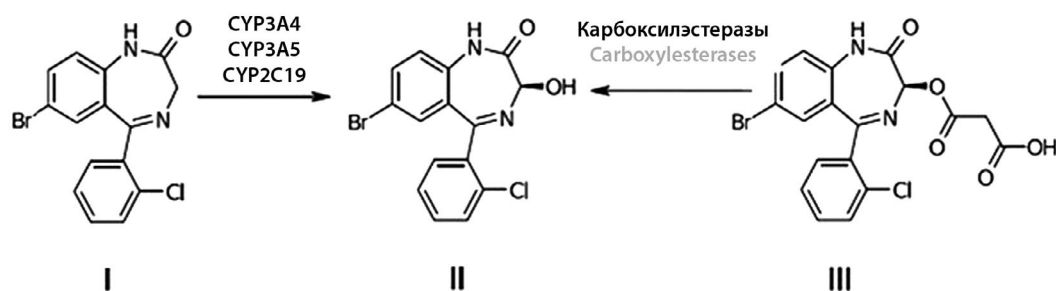


Рисунок 1. I – феназепам, II – 3-гидроксифеназепам, III – циназепам

Figure 1. I – phenazepam, II – 3-hydroxyphenazepam, III – cinazepam

200 нг/мл) был узким, а НПКО 3-ОН-ФЕН – высоким (16–1000 нг/мл).

Таким образом, в настоящее время в литературе отсутствует описание методики одновременного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН для ТЛМ с быстрым и простым методом пробоподготовки, широким аналитическим диапазоном и низким НПКО. Поэтому было решено разработать и валидировать соответствующую методику самостоятельно на основе ВЭЖХ-МС/МС.

Существенным этапом разработки методики количественного определения является выбор метода экстракции с учетом физико-химических свойств измеряемого вещества. Самыми распространенными методами пробоподготовки являются жидкостно-жидкостная экстракция (LLE, от англ. «liquid-liquid extraction») и SPE. В одних методиках применяли LLE [8, 13, 15, 19], в других – SPE [7, 17]. Однако в последнее время набирает популярность жидкостная экстракция с поддержкой (SLE), гибридный метод, сочетающий принципы и преимущества обоих подходов – LLE и SPE. SLE по сравнению с LLE позволяет получать экстракты с более низким содержанием примесей. При этом нивелируется возможность матричного эффекта из-за связывания с сорбентом картриджа (обычно кремнеземом) фосфолипидов и прочих компонентов матрицы, что повышает прецизионность методики в целом. Кроме того, SLE позволяет повышать степень экстракции, а также сокращает длительность пробоподготовки. Поэтому методы SPE и SLE для проведения ТЛМ были выбраны как предпочтительные.

ФЕН (CAS: 51753-57-2) и 3-ОН-ФЕН (CAS: 70030-11-4) – слабые основания с прогнозируемыми величинами 3,3 и 2,5 для липофильности ($\log P$), а также 10,8 и 11,58 для константы диссоциации (pK_a) соответственно. Внутренний стандарт (ВС) – метопролол (CAS: 51384-51-1, $pK_a = 9,56$ и $\log P = 1,88$) также является слабым основанием, не реагирует с исследуемыми аналитами, стабилен и имеет иное время удерживания по сравнению с ФЕН и 3-ОН-ФЕН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты, реактивы, оборудование и программное обеспечение

Субстанция феназепам (чистотой не менее 99,0 %, АО «Валента Фарм», Россия); метопролола тартрат (стандартный образец, количественное содержание 99,0–101,0 %, Sigma-Aldrich, США); стандартный образец 3-ОН-ФЕН (чистота не менее 99,0 %, ФГБНУ НИИ фармакологии, Россия); муравьиная кислота (класс «98 % pure», Sigma-Aldrich, США), метил-трет-бутиловый эфир (категория «LC-MS grade», Tedia Company, Inc., США); метанол (MeOH) и ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Dima Technology Inc., США). Картриджи: AccuBond SPE ODS-C18 (Agilent Technologies, США) и HyperSep™ SLE (pH7) (Thermo Fisher Scientific, США).

Оборудование для ВЭЖХ-МС/МС включало жидкостный хроматограф UltiMate 3000 (Dionex, США), оснащенный бинарным насосом, дегазатором, автоинжектором и модулем колонок, сопряженный с квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantiva (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве распыляющего и вспомогательного газа использовали азот от генератора Genius 1022 (PEAK Scientific, Великобритания), для деионизации воды использовали систему высокой очистки Simplicity® UV System (Millipore Corporation, США).

Анализ хроматограмм выполняли с использованием программного обеспечения Thermo Xcalibur.

Растворы, калибровочные стандарты и образцы контроля качества

Маточный раствор смеси ФЕН и 3-ОН-ФЕН с концентрацией каждого аналита 1,0 мг/мл готовили в MeOH. Рабочие растворы для калибровочных стандартов получали путем серийного разбавления MeOH до концентраций 10; 25; 50; 100; 500; 1000; 2500; 5000 и 10000 нг/мл. Отдельно приготавливали растворы для образцов контроля качества (QC) с получением итоговых концентраций аналитов 30; 200; 2000; 5000; 7500 нг/мл в MeOH. Метопролол (BC) растворяли в 100 % MeOH до концентрации 1,0 мг/мл и далее доводили до концентрации 100 нг/мл раствором $H_2O:MeOH$ (50/50 % v/v). Все растворы хранили при температуре 4 °C не более 1 месяца. Калибровочные образцы готовили добавлением к 400 мкл интактной человеческой плазмы (от 6 здоровых доноров) по 50 мкл рабочего раствора и BC. Для приготовления образцов QC к 400 мкл интактной человеческой плазмы добавляли по 50 мкл рабочего раствора и BC.

Пробоподготовка

SPE. Картриджи AccuBond SPE ODS-C18 кондиционировали 3 × 1 мл MeOH и уравнивали 3 × 1 мл деионизированной воды. Далее 0,5 мл плазмы разбавляли 0,5 мл воды, перемешивали на вибровстряхивателе типа Vortex и центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин. Супернатант наносился на картридж, далее проводили промывку 3 × 1 мл 5 % водным раствором MeOH, после чего аналиты элюировали 1 мл этанола 1 мин. Полученный элюат упаривали досуха под током азота при температуре 40 °C. Далее осадок растворяли в 250 мкл подвижной фазы перемешиванием на Vortex.

SLE. 0,5 мл плазмы разбавляли 0,5 мл воды, перемешивали на Vortex, центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин и наносили на картриджи HyperSep™ SLE. Для начала загрузки патронов применяли пульсирующий вакуум в течение 5 с. Затем после 5-минутного ожидания образцы элюировали 1 мл метил-трет-бутилового эфира с дальнейшим выпариванием в токе азота при 40 °C и перерастворением в 250 мкл подвижной фазы.

Условия хроматографического анализа

Подвижная фаза: 0,2%-й водный раствор муравьиной кислоты (элюент А) и 100%-й ацетонитрил (элюент В).

ФЕН, 3-ОН-ФЕН и ВС разделяли на колонке Hyper-sil GOLD™ (3,5 мкм, внутренний диаметр 50 × 2,1 мм, Thermo Fisher Scientific, США) с предколонкой HyPU-RITY Aquastar 4,0 × 10,0 мм (Thermo Fisher Scientific, США) и термостатированием при 20 °С.

Скорость подвижной фазы составляла 0,2 мл/мин при объеме инъекции 2 мкл. Оптимальное разделение пиков аналитов было достигнуто при использовании градиентного режима (таблица 1).

Таблица 1. Градиентный состав подвижной фазы

Table 1. Gradient composition of the mobile phase

Время, мин Time, min	Скорость потока ПФ, мл/мин Flow rate, ml/min	0,2%-й раствор муравьиной кислоты в воде 0.2 % aqueous formic acid	100%-й ацетонитрил Acetonitrile 100 %
0	0,2	85	15
0,5	0,2	85	15
7	0,2	15	85
10	0,2	85	15
12	0,2	85	15
12	Окончание анализа Stop analysis		

Примечание. ПФ – подвижная фаза.

Note. MP – mobile phase.

В указанных условиях время удерживания ФЕН составило $4,9 \pm 0,2$ мин, 3-ОН-ФЕН – $1,5 \pm 0,1$ мин, ВС – $2,1 \pm 0,1$ мин. Выбор метопролола в качестве ВС обусловлен схожестью его хроматографических характеристик с аналитами (рисунок 2).

Режим масс-спектрометрической детекции

Параметры масс-спектрометрического детектирования оптимизировали с использованием шприцевого насоса. В качестве метода ионизации использовали электроспрей (ESI) при положительной полярности (с образованием протонированных молекулярных ионов) и напряжении на капилляре 4000 В. Температура ион-трансферного капилляра и испарителя (азот) составляла 350 и 333 °С соответственно. Давление оболочечного (sheath), вспомогательного (aux) и очищающего (sweep) газа устанавливали на 30, 15 и 1 отн. ед. соответственно. Аргон высокой чистоты в камере соударений находился под давлением 1,5 мТорр.

Детектор работал в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Во время сбора данных время задержки (dwell time) составляло 100 мс. Параметры масс-спектрометрической детекции для аналитов и ВС – MRM-переходы и напряжение камеры соударений (CE) – представлены в таблице 2.

Спектр дочерних ионов 3-ОН-ФЕН иллюстрирует этап определения параметров MRM (рисунок 3).

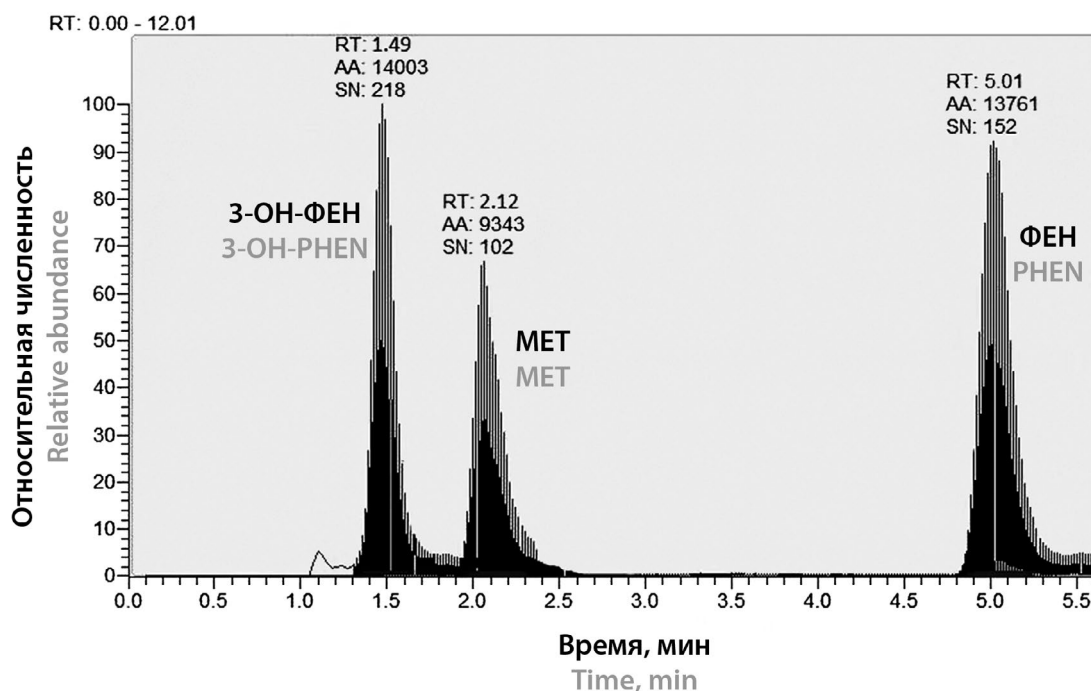


Рисунок 2. Хроматограмма феназепама и 3-гидроксифеназепама образца контроля качества (300 нг/мл)

Figure 2. Phenazepam and 3-hydroxyphenazepam chromatogram of quality control sample (300 ng/ml)

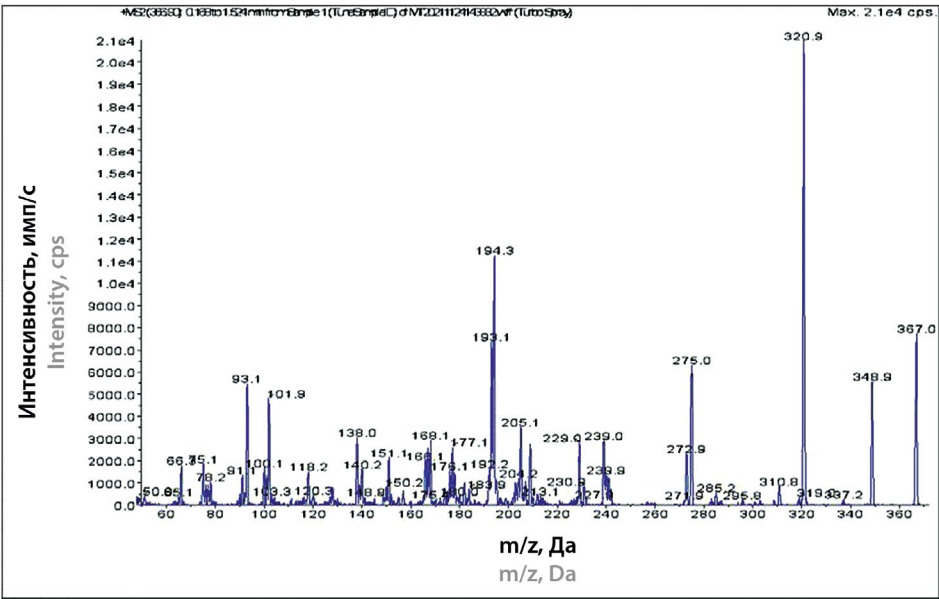


Рисунок 3. Спектр дочерних ионов 3-гидроксифеназепама
Figure 3. Daughter-ions spectrum of 3-hydroxyphenazepam

Таблица 2. Параметры
масс-спектрометрической детекции

Table 2. Parameters of mass spectrometric detection

Аналит Analyt	Ион-прекурсор, m/z Precursor ion, m/z	Дочерний ион, m/z Daughter ion, m/z	CE, В CE, V
ФЕН PHEN	349,0	206,0 (184,0)	7
3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN	366,9	320,9 (194,3)	7
BC IS	268,0	116,0	30

Примечание. В скобках приведены подтверждающие ионы.

Note. There are confirming ions in parentheses.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация проводилась в соответствии с требованиями ЕАЭС (Евразийского экономического союза), а также руководств ЕМА и FDA^{1,2} [20].

¹ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alta.ru/tamdoc/16sr0085/?ysclid=ls2wqwk0oy569347177>. Ссылка активна на 06.10.2023.

² ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 15.01.2024.

Селективность

Для оценки селективности проводили анализ образцов интактной плазмы крови, образцов с добавлением рабочих растворов смеси аналитов с получением концентрации 1,0 нг/мл для каждого из них (на уровне НПКО), а также раствора ВС (для итоговой концентрации 10 нг/мл). При обоих методах пробоподготовки отклик сигнала детектора для интактной плазмы, соответствующий MRM-переходам ФЕН и 3-ОН-ФЕН, не превышал 20 % от уровня сигнала образцов с добавлением рабочих растворов, а также 5 % от сигнала ВС. Таким образом, методика продемонстрировала селективность независимо от метода пробоподготовки.

Калибровочная зависимость

Калибровочные зависимости для ФЕН и 3-ОН-ФЕН были линейны в диапазоне концентраций 1–1000 нг/мл с НПКО, равным 1,0 нг/мл. Соотношение сигнал/шум на уровне НПКО было более чем в 10 раз (S/N = 15) больше уровня сигнала холостого образца.

Для обоих методов экстракции для каждого аналита были построены калибровочные зависимости. Коэффициент детерминации во всех случаях превосходил величину 0,999 (таблица 3).

Все концентрации калибровочных стандартов, вычисленные обратным пересчетом, находились в пределах 20 % от номинальных значений на уровне НПКО и 15 % для всех других уровней концентрации.

Таблица 3. Калибровочные кривые, полученные с помощью линейной регрессии

Table 3. Calibration curves generated by a linear regression

	SPE	SLE
ФЕН PHEN	$Y = 0,2265 + 0,0075 \cdot X$ ($R^2 = 0,9995$)	$-0,1469 + 0,0073 \cdot X$ ($R^2 = 0,9998$)
3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN	$-0,0570 + 0,0259 \cdot X$ ($R^2 = 0,9992$)	$-0,0458 + 0,0272 \cdot X$ ($R^2 = 0,9995$)

Примечание. Y – отношение площади пика каждого анализируемого вещества к IS; X – концентрация аналита; R^2 – коэффициент детерминации.

Note. Y – peak area ratios of each analyte to IS; X – the concentration of analyte; R^2 – coefficient of determination.

Точность и прецизионность

Правильность и прецизионность метода в пределах одного дня (intra-day) оценивались путем анализа QC в 5 повторах на 5 уровнях концентрации (1; 3; 50; 500 и 750 нг/мл).

Междневную правильность и прецизионность (inter-day) определяли анализом образцов QC на каждом уровне концентрации в течение 3 последовательных дней. Средние величины рассчитанных концентраций находились в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений для образцов QC, а для уровня НПКО – в пределах $\pm 20\%$ от номинальных значений (таблица 4).

Анализ ANOVA для параметров «правильность» и «прецизионность» включал следующие факторы: уровень концентрации, тип валидации (внутридневная или междневная), аналит (ФЕН или 3-ОН-ФЕН), а также метод пробоподготовки (SPE или SLE). Было установлено, что метод пробоподготовки не влияет на параметр «правильность» (p -величина F -теста составила 0,9773). При этом было показано, что величина, отражающая прецизионность (RSD), при методе SLE была достоверно меньше по сравнению с методом SPE (p -величина F -теста составила 0,0294). Таким образом, случайная ошибка измерения при SLE ниже, чем при SPE.

Степень экстракции и эффект матрицы (ЭМ)

Степень экстракции оценивали как $(\text{tg } \alpha / \text{tg } \beta) \times 100\%$, где α – угол калибровочной зависимости, построенной путем добавления стандартных растворов к подвижной фазе, а β – угол калибровочной зависимости, построенной для калибровочных образцов (с добавлением ВС). Степень экстракции составила 89,5 и 86,5 % для метода SPE, а также 96,4 и 92,9 % для метода SLE для ФЕН и 3-ОН-ФЕН соответственно.

ЭМ оценивали на уровне концентраций образцов QC как отношение площадей пиков аналита, разбавленного в бланковой плазме и разведенной в 10 раз плазме подвижной фазе. ЭМ для обоих аналитов не превышал 5 % отклонения, составляя 94,3 и 92,5 % для ФЕН и 3-ОН-ФЕН при SPE, а также 98,9 и 96,4 % для ФЕН и 3-ОН-ФЕН при SLE. ЭМ, нормализованный по ВС, составил 93,1 и 94,6 % для ФЕН и 3-ОН-ФЕН при SPE, а также 98,4 и 97,1 % для ФЕН и 3-ОН-ФЕН при SLE. Как видно из представленных показателей, метод SLE по сравнению с SPE показал снижение вли-

яния матрицы на отклик масс-спектрометрического детектора. Нормализованный по ВС ЭМ подтверждает верность выбора метопролола в качестве ВС.

Таблица 4. Правильность и точность методик определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН при разных процедурах экстракции ($n = 5$)Table 4. Accuracy and precision of methods for determining FEN and 3-OH-FEN for different extraction procedures ($n = 5$)

Концентрация добавленная (нг/мл) Concentration added (ng/ml)	Правильность (E, %) Accuracy (E, %)	Прецизионность (RSD, %) Precision (RSD, %)	Правильность (E, %) Accuracy (E, %)	Прецизионность (RSD, %) Precision (RSD, %)
	SPE		SLE	
Внутридневная Insideday	ФЕН PHEN			
1	-0,14	16,05	7,41	11,44
3	6,93	8,29	10,00	3,53
50	3,31	11,78	4,31	10,09
500	6,39	10,34	6,04	10,51
750	4,33	10,76	4,33	10,76
Внутридневная Insideday	3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN			
1	6,28	15,61	8,44	12,13
3	-3,69	11,20	-5,64	7,30
50	2,09	8,16	6,71	5,79
500	0,75	10,60	-0,32	8,51
750	12,92	6,14	3,03	5,37
Междневная Interday	ФЕН PHEN			
1	8,76	13,19	7,27	10,86
3	10,54	6,62	9,03	4,42
50	5,45	2,36	5,78	1,94
500	9,64	2,90	9,52	3,10
750	3,47	1,20	3,47	1,20
Междневная Interday	3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN			
1	9,61	15,43	7,27	9,3
3	-2,84	6,21	-3,49	6,44
50	3,40	2,14	4,94	2,38
500	-0,54	1,41	-0,70	1,21
750	6,30	5,73	6,30	5,73

Результаты валидации подтвердили соответствие методики современным регуляторным требованиям ЕАЭС, ЕМА и FDA.

Эффект переноса

Эффект переноса оценивали, вводя холостые образцы после градуировочных растворов в концентрации 1000 нг/мл. Перенос в холостой образец не должен превышать 20 % величины НПКО для аналита и 5 % для ВС. Эффект переноса не наблюдали при обоих методах пробоподготовки, ни для аналитов, ни для ВС.

Стабильность

Стабильность исходных и рабочих растворов анализируемого вещества и ВС. При хранении рабочих растворов аналитов и ВС в течение одного месяца при температуре 4 °С снижение уровня измеряемой концентрации составило 16,8 и 17,6 % для ФЕН и 3-ОН-ФЕН, не влияя при этом на стабильность рабочего раствора ВС (снижение на 1,7 %). Снижение уровня измеряемой концентрации при хранении рабочих растворов аналитов в течение 10 дней не превышало 5 % для обоих аналитов.

Стабильность замороженного и размороженного биологического образца, содержащего анализируемые вещества. Для оценки стабильности образцов при замораживании – оттаивании определяли стабильность QC-образцов для трех уровней концентраций ФЕН и 3-ОН-ФЕН (QC1, QC3 и QC5) в плазме после 3 циклов замораживания – оттаивания (при комнатной температуре). При этом была продемонстрирована стабильность обоих аналитов: отклонения не превышали 15 % (при анализе обоими методами пробоподготовки).

Краткосрочная стабильность аналитов в матрице при комнатной температуре. Для оценки стабильности аналитов в плазме крови человека использовали образцы QC2 (соответствующие ЗНПКО – 3 нг/мл) и QC5 (750 нг/мл), которые хранились при комнатной температуре в течение 24 и 48 ч до пробоподготовки. Далее проводился анализ хранившихся образцов наряду со свежеприготовленными в составе одной аналитической серии. Рассчитанную концентрацию после хранения образцов вычитали из величины концентрации свежеприготовленных образцов, далее делили на концентрацию свежеприготовленных образцов и умножали на 100 %. При хранении матрицы свыше 48 часов отклонение превышало 15 % для 3-ОН-ФЕН, составив 33,2 и 36,5 % при SPE и 34,6 и 33,4 % при SLE, для образцов QC2 и QC5 соответственно. При хранении в пределах 24 ч для 3-ОН-ФЕН, а также при хранении в пределах 24 или 48 ч для ФЕН оценка стабильности не превышала 15%-й порог.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложены и валидированы 2 экспрессные, высокочувствительные и специфичные методики определения содержания ФЕН и его активного метаболита

в плазме крови человека при разных типах экстракции (SPE и SLE). Время пробоподготовки при обоих методах экстракции не превышало 15 мин. Обе методики успешно прошли валидацию, результаты которой показали их соответствие современным требованиям. SLE достоверно снижала случайную ошибку измерения, оцененную как прецизионность, а также несколько снижала матричный эффект. Независимо от метода пробоподготовки длительность хранения рабочих растворов ФЕН и 3-ОН-ФЕН не должна превышать 10 дней, а длительность хранения этих аналитов в матрице при комнатной температуре не должна превышать 24 ч. Близкое время удерживания метопролола с аналитами при хроматографическом разделении, хорошая стабильность при хранении его рабочих растворов, а также снижение влияния матрицы при нормализации по ВС подтверждают правильность выбора метопролола в качестве ВС.

Низкий уровень НПКО – 1 нг/мл для обоих аналитов, широкий аналитический диапазон (1–1000 нг/мл), а также отсутствие необходимости в дейтерированном ВС обозначают перспективу применения разработанных аналитических методик как в исследованиях фармакокинетики и биоэквивалентности, ТЛМ, так и в токсикологических лабораториях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moosmann B., Huppertz L. M., Hutter M., Buchwald A., Ferlaino S., Auwärter V. Detection and identification of the designer benzodiazepine flubromazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics. *Journal of Mass Spectrometry*. 2013;48(11):1150–1159.
2. Воронина Т. А., Середенин С. Б. Перспективы поиска новых анксиолитиков. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;65(5):4–17.
3. Городничев А. В., Костюкова Е. Г. Место феназепама в современном применении бензодиазепиновых транквилизаторов. *Современная терапия психических расстройств*. 2011;2:26–29.
4. Середенин С. Б., Воронина Т. А., Незнамов Г. Г., Жердев В. П. Феназепам: 25 лет в медицинской практике. Москва: Наука; 2007. 222 с.
5. Осадший Ю. Ю., Вобленко Р. А., Арчаков Д. С., Тараканова Е. А. Место бензодиазепинов в современной терапии психических расстройств (обзор доказательных исследований). *Современная терапия психических расстройств*. 2016;1:2–10.
6. Brunetti P., Giorgetti R., Tagliabracci A., Huestis M. A., Bussardò F. P. Designer benzodiazepines: a review of toxicology and public health risks. *Pharmaceuticals*. 2021;14(6):560. DOI: 10.3390/ph14060560.
7. Kerrigan S., Mellon M. B., Hinnens P. Detection of phenazepam in impaired driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(8):605–610. DOI:10.1093/jat/bkt075.
8. Stephenson J. B., Golz D. E., Brasher M. J. Phenazepam and its Effects on Driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(1):25–29. DOI: 10.1093/jat/bks080.
9. Воронина Т. А., Ларионов В. Б., Головенко Н. Я., Неробкова Л. Н., Гайдуков И. О. Роль 3-оксиметаболита феназепама и леваны в реализации их нейротропного действия. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2014;1:44–49.
10. Zastrozhin M. S., Skryabin V. Yu., Sorokin A. S., Petukhov A. E., Smirnov V. V., Pankratenko E. P., Grishina E. A.,

- Ryzhikova K. A., Panov A. S., Savchenko L. M., Bryun E. A., Sychev D. A. CYP3A subfamily activity affects the equilibrium concentration of Phenazepam® in patients with anxiety disorders and comorbid alcohol use disorder. *Pharmacogenomics*. 2020;21(7):449–457. DOI: 10.2217/pgs-2019-0071.
11. Pennings E., van Amsterdam J. G. C., Schoones J. W., Kershaw S. Phenazepam Pre-Review Report Agenda item 5.8 Expert Committee on Drug Dependence Thirty-seventh Meeting. *World Health Organization*. 2015.
12. Жердев В. П., Воронина Т. А., Гарибова Т. Л., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Сариев А. К., Тохмахчи В. Н., Васильев А. Е. Оценка фармакокинетики и эффективности феназепама у крыс при трансдермальном и энтеральном способах введения. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2003;66(1):50–53.
13. Ékonomov A. L., Zherdev V. P. Method of quantitative gas-chromatographic determination of phenazepam and its metabolite 3-hydroxyphenazepam in plasma. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1980;14(8):579–582.
14. O'Connor L. C., Torrance H. J., McKeown D. A. ELISA detection of phenazepam, etizolam, pyrazolam, flubromazepam, diclazepam and delorazepam in blood using Immunoanalysis® benzodiazepine kit. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;40(2):159–161. DOI: 10.1093/jat/bkv122.
15. Mastrovito R. A., Papsun D. M., Logan B. K. The Development and Validation of a Novel Designer Benzodiazepines Panel by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021;45(5):423–428. DOI: 10.1093/jat/bkab013.
16. Yang C.-A., Tsai C.-Y., H.-C. Liu, Liu R. H., Lin D.-L. Designer benzodiazepines and their metabolites in post- and antemortem specimens: Quantitation by UHPLC-MS/MS and findings in Taiwan. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 2022;34(3):S180. DOI: 10.1016/j.toxac.2022.06.312.
17. Mei V., Concheiro M., Pardi J., Cooper G. Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of 13 Designer Benzodiazepines in Blood. *Journal of Analytical Toxicology*. 2019;43(9):688–695. DOI: 10.1093/jat/bkz063.
18. Pettersson Bergstrand M., Beck O., Helander A. Urine analysis of 28 designer benzodiazepines by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry*. 2018;10:25–32. DOI: 10.1016/j.clinms.2018.08.004.
19. Crichton M. L., Shenton C. F., Drummond G., Beer L. J., Seetohul L. N., Maskell P. D. Analysis of phenazepam and 3-hydroxyphenazepam in post-mortem fluids and tissues. *Drug Testing and Analysis*. 2015;7(10):926–936. DOI: 10.1002/dta.1790.
20. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. New Hampshire: Biopharmaceutics; 2018. 44 p.
- formed consensus. *Current Therapy of Mental Disorders*. 2016;1:2–10. (In Russ.)
6. Brunetti P., Giorgetti R., Tagliabracchi A., Huestis M. A., Busardò F. P. Designer benzodiazepines: a review of toxicology and public health risks. *Pharmaceuticals*. 2021;14(6):560. DOI: 10.3390/ph14060560.
7. Kerrigan S., Mellon M. B., Hinners P. Detection of phenazepam in impaired driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(8):605–610. DOI:10.1093/jat/bkt075.
8. Stephenson J. B., Golz D. E., Brasher M. J. Phenazepam and its Effects on Driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(1):25–29. DOI: 10.1093/jat/bks080.
9. Voronina T. A., Larionov V. B., Golovenko N. Y., Nerobkova L. N., Gaidukov I. O. Role of 3-oximetabolite phenazepam and levan in realize their neurotropic efficacy. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2014;1:44–49 (In Russ.)
10. Zastrozhin M. S., Skryabin V. Yu., Sorokin A. S., Petukhov A. E., Smirnov V. V., Pankratenko E. P., Grishina E. A., Ryzhikova K. A., Panov A. S., Savchenko L. M., Bryun E. A., Sychev D. A. CYP3A subfamily activity affects the equilibrium concentration of Phenazepam® in patients with anxiety disorders and comorbid alcohol use disorder. *Pharmacogenomics*. 2020;21(7):449–457. DOI: 10.2217/pgs-2019-0071.
11. Pennings E., van Amsterdam J. G. C., Schoones J. W., Kershaw S. Phenazepam Pre-Review Report Agenda item 5.8 Expert Committee on Drug Dependence Thirty-seventh Meeting. *World Health Organization*. 2015.
12. Zherdev V. P., Voronina T. A., Garibova T. L., Kolyvanov G. B., Litvin A. A., Sariev A. K., Tohmahchi V. N., Vasil'ev A. E. A comparative study of the pharmacokinetics and efficacy of fenazepam upon transdermal and enteral administration. *Экспериментальная и Клиническая Фармакология*. 2003;66(1):50–53 (In Russ.)
13. Ékonomov A. L., Zherdev V. P. Method of quantitative gas-chromatographic determination of phenazepam and its metabolite 3-hydroxyphenazepam in plasma. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1980;14(8):579–582.
14. O'Connor L. C., Torrance H. J., McKeown D. A. ELISA detection of phenazepam, etizolam, pyrazolam, flubromazepam, diclazepam and delorazepam in blood using Immunoanalysis® benzodiazepine kit. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;40(2):159–161. DOI: 10.1093/jat/bkv122.
15. Mastrovito R. A., Papsun D. M., Logan B. K. The Development and Validation of a Novel Designer Benzodiazepines Panel by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021;45(5):423–428. DOI: 10.1093/jat/bkab013.
16. Yang C.-A., Tsai C.-Y., H.-C. Liu, Liu R. H., Lin D.-L. Designer benzodiazepines and their metabolites in post- and antemortem specimens: Quantitation by UHPLC-MS/MS and findings in Taiwan. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 2022;34(3):S180. DOI: 10.1016/j.toxac.2022.06.312.
17. Mei V., Concheiro M., Pardi J., Cooper G. Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of 13 Designer Benzodiazepines in Blood. *Journal of Analytical Toxicology*. 2019;43(9):688–695. DOI: 10.1093/jat/bkz063.
18. Pettersson Bergstrand M., Beck O., Helander A. Urine analysis of 28 designer benzodiazepines by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry*. 2018;10:25–32. DOI: 10.1016/j.clinms.2018.08.004.
19. Crichton M. L., Shenton C. F., Drummond G., Beer L. J., Seetohul L. N., Maskell P. D. Analysis of phenazepam and 3-hydroxyphenazepam in post-mortem fluids and tissues. *Drug Testing and Analysis*. 2015;7(10):926–936. DOI: 10.1002/dta.1790.
20. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. New Hampshire: Biopharmaceutics; 2018. 44 p.

REFERENCES

1. Moosmann B., Huppertz L. M., Hutter M., Buchwald A., Ferlino S., Auwärter V. Detection and identification of the designer benzodiazepine flubromazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics. *Journal of Mass Spectrometry*. 2013;48(11):1150–1159.
2. Voronina T. A., Seredenin S. B. Prospects of search for new anxiolytics. *Экспериментальная и Клиническая Фармакология*. 2002;65(5):4–17. (In Russ.)
3. Gorodnichev A. V., Kostyukova E. G. The place of phenazepam in the modern use of benzodiazepine tranquilizers. *Current Therapy of Mental Disorders*. 2011;2:26–29 (In Russ.)
4. Seredenin S. B., Voronina T. A., Neznamov G. G., Zherdev V. P. Phenazepam: 25 years in medical practice. Moscow: Nauka; 2007. 222 p. (In Russ.)
5. Osadshiy Y. Y., Voblenko R. A., Archakov D. S., Tarakanova E. A. Benzodiazepines. An attempt to arrive at an informed consensus. *Current Therapy of Mental Disorders*. 2016;1:2–10. (In Russ.)
6. Brunetti P., Giorgetti R., Tagliabracchi A., Huestis M. A., Busardò F. P. Designer benzodiazepines: a review of toxicology and public health risks. *Pharmaceuticals*. 2021;14(6):560. DOI: 10.3390/ph14060560.
7. Kerrigan S., Mellon M. B., Hinners P. Detection of phenazepam in impaired driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(8):605–610. DOI:10.1093/jat/bkt075.
8. Stephenson J. B., Golz D. E., Brasher M. J. Phenazepam and its Effects on Driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(1):25–29. DOI: 10.1093/jat/bks080.
9. Voronina T. A., Larionov V. B., Golovenko N. Y., Nerobkova L. N., Gaidukov I. O. Role of 3-oximetabolite phenazepam and levan in realize their neurotropic efficacy. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2014;1:44–49 (In Russ.)
10. Zastrozhin M. S., Skryabin V. Yu., Sorokin A. S., Petukhov A. E., Smirnov V. V., Pankratenko E. P., Grishina E. A., Ryzhikova K. A., Panov A. S., Savchenko L. M., Bryun E. A., Sychev D. A. CYP3A subfamily activity affects the equilibrium concentration of Phenazepam® in patients with anxiety disorders and comorbid alcohol use disorder. *Pharmacogenomics*. 2020;21(7):449–457. DOI: 10.2217/pgs-2019-0071.
11. Pennings E., van Amsterdam J. G. C., Schoones J. W., Kershaw S. Phenazepam Pre-Review Report Agenda item 5.8 Expert Committee on Drug Dependence Thirty-seventh Meeting. *World Health Organization*. 2015.
12. Zherdev V. P., Voronina T. A., Garibova T. L., Kolyvanov G. B., Litvin A. A., Sariev A. K., Tohmahchi V. N., Vasil'ev A. E. A comparative study of the pharmacokinetics and efficacy of fenazepam upon transdermal and enteral administration. *Экспериментальная и Клиническая Фармакология*. 2003;66(1):50–53 (In Russ.)
13. Ékonomov A. L., Zherdev V. P. Method of quantitative gas-chromatographic determination of phenazepam and its metabolite 3-hydroxyphenazepam in plasma. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1980;14(8):579–582.
14. O'Connor L. C., Torrance H. J., McKeown D. A. ELISA detection of phenazepam, etizolam, pyrazolam, flubromazepam, diclazepam and delorazepam in blood using Immunoanalysis® benzodiazepine kit. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;40(2):159–161. DOI: 10.1093/jat/bkv122.
15. Mastrovito R. A., Papsun D. M., Logan B. K. The Development and Validation of a Novel Designer Benzodiazepines Panel by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021;45(5):423–428. DOI: 10.1093/jat/bkab013.
16. Yang C.-A., Tsai C.-Y., H.-C. Liu, Liu R. H., Lin D.-L. Designer benzodiazepines and their metabolites in post- and antemortem specimens: Quantitation by UHPLC-MS/MS and findings in Taiwan. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 2022;34(3):S180. DOI: 10.1016/j.toxac.2022.06.312.
17. Mei V., Concheiro M., Pardi J., Cooper G. Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of 13 Designer Benzodiazepines in Blood. *Journal of Analytical Toxicology*. 2019;43(9):688–695. DOI: 10.1093/jat/bkz063.
18. Pettersson Bergstrand M., Beck O., Helander A. Urine analysis of 28 designer benzodiazepines by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry*. 2018;10:25–32. DOI: 10.1016/j.clinms.2018.08.004.
19. Crichton M. L., Shenton C. F., Drummond G., Beer L. J., Seetohul L. N., Maskell P. D. Analysis of phenazepam and 3-hydroxyphenazepam in post-mortem fluids and tissues. *Drug Testing and Analysis*. 2015;7(10):926–936. DOI: 10.1002/dta.1790.
20. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. New Hampshire: Biopharmaceutics; 2018. 44 p.



Роль доксорубина в формировании кардиотоксичности – консенсусное заявление.

Часть II. Кардиотоксичность доксорубина, не связанная с миоцитами, и стратегия кардиопротекции (обзор)

Д. А. Андреев, Е. И. Балакин✉, А. С. Самойлов, В. И. Пустовойт

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна ФМБА России». 123098, Россия, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23

✉ Контактное лицо: Балакин Евгений Игоревич. E-mail: evgbalakin@yandex.ru

ORCID: Д. А. Андреев – <https://orcid.org/0009-0004-5936-827X>;
Е. И. Балакин – <https://orcid.org/0000-0001-5545-135X>;
А. С. Самойлов – <https://orcid.org/0000-0002-9241-7238>;
В. И. Пустовойт – <https://orcid.org/0000-0003-3396-5813>.

Статья поступила: 29.01.2024

Статья принята в печать: 23.08.2024

Статья опубликована: 26.08.2024

Резюме

Введение. Применение доксорубина в клинической практике сопровождается кумулятивным и дозозависимым токсическим воздействием на кардиомиоциты, приводящим к увеличению риска смертности среди пациентов с онкологическими заболеваниями и, как следствие, возникновению ограничений в отношении его применения.

Текст. Опасной нежелательной реакцией доксорубина является кардиомиопатия, приводящая к застойной сердечной недостаточности. В основе кардиотоксичности лежат как минимум несколько патофизиологических механизмов (детальнее описанных в первой части обзора), приводящих к повреждению кардиомиоцитов в результате окислительного стресса с образованием свободных радикалов, нарушения функции митохондрий, аутофагии, высвобождения оксида азота и медиаторов воспаления, а также изменения экспрессии генов и белков, что приводит к апоптозу. В текущей (второй) части обзора представлена подробная информация о современном понимании патофизиологических механизмов, лежащих в основе уже описанной кардиотоксичности, и влияния доксорубина на другие клетки сердца. Использование кардиопротективных стратегий позволит снизить выраженность и вероятность развития кардиотоксичности. В данной статье описаны стратегии, основанные на снижении максимальной кумулятивной дозы, изменении характера введения доксорубина, использовании пегилированных липосомальных форм и кардиопротективных средств, а также физических нагрузок.

Заключение. Несмотря на огромное количество научных работ, посвященных различным аспектам кардиотоксичности доксорубина, ее профилактики и лечения, данный вопрос требует более тщательного изучения и выработки более совершенных методов ранней диагностики, профилактики и более эффективной терапии этого осложнения.

Ключевые слова: антрациклиновый химиопрепарат, доксорубин, кардиотоксичность, кардиомиоциты, митохондрии

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

Вклад авторов. Д. А. Андреев и Е. И. Балакин проводили поиск литературных данных. А. С. Самойлов систематизировал литературные данные. В. И. Пустовойт участвовал в оформлении статьи, формировал заключение.

Благодарность. Исследование проводилось на инициативной основе.

Для цитирования: Андреев Д. А., Балакин Е. И., Самойлов А. С., Пустовойт В. И. Роль доксорубина в формировании кардиотоксичности – консенсусное заявление. Часть II. Кардиотоксичность доксорубина, не связанная с миоцитами, и стратегия кардиопротекции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):208–218. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1730>

The role of doxorubicin in the formation of cardiotoxicity is a consensus statement.

Part II. Cardiotoxicity of doxorubicin unrelated to myocytes and cardioprotection strategy (review)

Dmitry A. Andreev, Evgenii I. Balakin✉, Alexander S. Samoilov, Vasily I. Pustovoit

State Research Center – A. I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency. 23, Marshala Novikova str., Moscow, 123098, Russia

✉ **Corresponding author:** Evgenii I. Balakin. **E-mail:** evgbalakin@yandex.ru

ORCID: Dmitry A. Andreev – <https://orcid.org/0009-0004-5936-827X>;
Evgenii I. Balakin – <https://orcid.org/0000-0001-5545-135X>;
Alexander S. Samoilov – <https://orcid.org/0000-0002-9241-7238>;
Vasily I. Pustovoit – <https://orcid.org/0000-0003-3396-5813>.

Received: 29.01.2024

Accepted: 23.08.2024

Published: 26.08.2024

Abstract

Introduction. The use of doxorubicin in clinical practice has shown cumulative and dose-dependent toxic effects on cardiomyocytes, leading to an increase of mortality risk among patients with cancer and as a resulting to restrictions in the indications for its use.

Text. A dangerous adverse reaction of doxorubicin is cardiomyopathy, leading to congestive heart failure. Cardiotoxicity is based on at least several pathophysiological mechanisms (described in more detail in the first part of the review), leading to damage to cardiomyocytes as a result of oxidative stress with the formation of free radicals, dysfunction of mitochondria, autophagy, release of nitric oxide and inflammatory mediators, as well as changes in gene expression and proteins leading to apoptosis. The current (second) part of the review provides detailed information on the actual understanding of the pathophysiological mechanisms underlying the described cardiotoxicity, the effect of doxorubicin on other heart cells. The use of cardioprotective strategies will reduce the severity and likelihood of developing cardiotoxicity. This article describes strategies based on reducing the maximum cumulative dose, changing the speed of doxorubicin administration, using pegylated liposomal formulations and cardioprotective agents, as well as exercise.

Conclusion. Despite the huge number of scientific papers devoted to various aspects of cardiotoxicity of doxorubicin, its prevention and treatment, this issue requires more careful study and development of more advanced methods of early diagnosis, prevention and more effective therapy the complication.

Keywords: anthracycline chemotherapy drug, doxorubicin, cardiotoxicity, cardiomyocytes, mitochondria

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. Dmitry A. Andreev and Evgenii I. Balakin conducted a search for literary data. Alexander S. Samoilov systematized literary data. Vasily I. Pustovoit participated in the design of the article, formed the conclusion.

Acknowledgment. The study was conducted on an initiative basis.

For citation: Andreev D. A., Balakin E. I., Samoilov A. S., Pustovoit V. I. The role of doxorubicin in the formation of cardiotoxicity is a consensus statement. Part II. Cardiotoxicity of doxorubicin unrelated to myocytes and cardioprotection strategy. *Drug development & registration*. 2024;13(3):208–218. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1730>

ВВЕДЕНИЕ

Ведущими причинами, ограничивающими дозу доксорубина в терапии онкологических заболеваний, являются нежелательные реакции, в первую очередь характеризующиеся кардиомиопатией. В наши дни доксорубин остается наиболее широко назначаемым лекарственным препаратом при различных онкологических заболеваниях [1]. Описанная

токсичность вносит ряд ограничений применения, связанных с максимально возможной дозой. Тем не менее эффективность доксорубина в низких дозах была подтверждена при широком виде раков, включая лимфомы, лейкозы, солидные опухоли молочной железы, рак желудка, гинекологические опухоли, опухоли мочевого пузыря и эндокринной системы, головного мозга, а также саркомы Юинга и Капоши [2].

Среди осложнений терапии в настоящее время наиболее трудным в прогнозе и последующем лечении является развитие кардиомиопатии и в конечном счете хронической сердечной недостаточности [3]. Так, при дозе лекарственного препарата 550 мг/м² частота развития хронической сердечной недостаточности у пациентов, получающих терапию, составляет 26 % [4]. Прогрессирующая кардиотоксичность после применения доксорубицина может проявляться как рестриктивная кардиомиопатия у молодых пациентов или как хроническая дилатационная кардиомиопатия (со снижением фракции выброса левого желудочка) у пожилых больных [5, 6]. Своевременное выявление донозологических изменений сердечно-сосудистой системы на ранних стадиях после окончания лечения способствует полному или частичному восстановлению функций сердца [7–9]. При инструментальном обследовании доксорубициновая кардиотоксичность подтверждается увеличением камер желудочков [10, 11]. Гистологические исследования подтвердили наличие интерстициального фиброза, потерю миофибриллярных и микроваскуляризацию кардиомиоцитов [12].

Большей частью исследования проведены в отношении токсического воздействия доксорубицина на кардиомиоциты, однако и другие клетки сердца, например кардиальные фибробласты, клетки эндотелия, клетки гладкой мускулатуры сосудов сердца, являются объектами повреждения [1]. Более того, экстракардиальные недифференцированные клетки, вовлеченные в поддержание гомеостаза кардиомиоцитов, также подвергаются негативному воздействию [13].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поиск источников литературы проводился, как и в первой части («Роль доксорубицина в формировании кардиотоксичности – общепринятое утверждение. Часть I: распространенность и механизмы формирования»), в базах данных Google Scholar, MEDLINE, eLIBRARY, EMBASE и PubMed [1]. В целях получения более релевантных ответов в вышеупомянутых научных информационных системах в поисковом режиме формировался запрос: «доксорубин» или «влияние доксорубицина на другие клетки сердца» с датой публикации до 1 сентября 2023 года. Возможность включения публикаций определялась с учетом названия и аннотации к каждой отобранной статье. После этого в целевых статьях изучался список литературы всех охваченных исследований для получения дополнительной информации. По завершении системного обзора проводился полный анализ текста отобранных публикаций. Наиболее информативные данные извлекались для последующего формирования основы текущей статьи. В процессе системного анализа определены механизмы влияния доксорубицина на другие клетки сердца.

Поиск в научных информационных системах (Google Scholar, MEDLINE, eLIBRARY, EMBASE и PubMed) сформировал пул из 811 статей. Удаление нерелевантных публикаций снизило общее количество до 194, из которых 109 публикаций было исключено после полнотекстового анализа, а 87 работ соответствовало критериям анализа.

В результате анализа опубликованных статей сформировано два обзора, которые в себя включают: первую часть («Кардиотоксичность, ее распространенность и механизмы формирования доксорубициновой кардиотоксичности») с цитированием 90 публикаций и вторую часть («Кардиотоксичность доксорубицина, не связанная с миоцитами, и стратегия кардиопротекции») с цитированием 87 статей [1], представленную настоящей публикацией.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кардиальные клетки-предшественники

У взрослого человека в сердце присутствует популяция примитивных клеток, которые в обычном состоянии обеспечивают тканевой гомеостаз, а в патологических условиях стимулируют регенерацию кардиомиоцитов [14–17]. Кардиальные клетки-предшественники (CPC) – самообновляемые колоний-образующие и мультипотентные клетки, которые могут быть предшественниками кардиомиоцитов, гладкомышечных и эндотелиальных клеток. В ряде исследований [18–23] было показано вовлечение CPC у человека в процесс старения и некоторые патологические состояния. Более того, старение популяции стволовых клеток было ассоциировано с началом и прогрессированием сердечной недостаточности [18–24]. Базируясь на вышеуказанных данных, ряд исследований [25–28] продемонстрировал, что кардиотоксичность доксорубицина не ограничивается исключительно кардиомиоцитами, но также распространяется на CPC, демонстрируя, таким образом, альтернативный механизм. На модели доксорубицининдуцированной сердечной недостаточности у животных было отмечено ингибирование пролиферации CPC, что в комбинации с оксидативным повреждением ДНК, прекращением роста, старением клеток и апоптозом приводит к практически полному истощению пула CPC. Блокирование активации CPC, связанное с регенерацией кардиомиоцитов, приводило к их преждевременному старению и гибели [26]. Клиническая связь с данными, полученными у животных, была показана при аутопсии тканей онкологических пациентов, которые скончались от сердечной недостаточности, развившейся после химиотерапии, включающей доксорубин. У данных пациентов с доксорубицининдуцированной кардиомиопатией была обнаружена большая фракция стареющих клеток CPC человека (hCPC) в сравнении с группой, соответствующей по возрасту, но в которой респонденты умерли не от сердечно-сосудистых

причин [29]. Маркер старения p16INK4a у большинства hCPC превышал значения в сравнении с данными, полученными при изучении обычного старения кардиомиоцитов и других кардиомиопатиях [19, 24, 30]. Эти данные были комплементарны данным тестов *in vitro*, показавшим, что изолированные hCPC были чувствительны к доксорубину и их выживаемость, рост и нормальное функционирование были нарушены. Повреждение ДНК в hCPC было показано увеличением экспрессии фосфорилированных форм гистонов H2(γH2AX) и аккумуляцией стареющих клеток, которые негативно влияли на гомеостаз кардиомиоцитов, делая их более чувствительным к экзогенному повреждению.

Для выполнения своих функций жизнеспособные клетки-предшественники должны достичь места повреждения и дифференцировать до способности восстановления повреждения. IGF-1/IGF-1R- и HGF/c-Met-системы детерминируют функцию CPC, способствующих регенерации миокарда [31]. IGF-1R активирует митогенный и антиапоптозный потенциал [32, 33], в то время как c-Met – это рецептор HGF, цитокина, который стимулирует миграцию клеток в область повреждения [33, 34]. Доксорубин снижает экспрессию IGF-1R и c-Met в hCPC, и этот негативный эффект продолжается в течение всего времени лечения [29].

В дополнение к индукции старения и гибели CPC доксорубин негативно взаимодействует с системой факторов роста, регулирующей регенерацию сердца, что приводит к неадекватному регенеративному ответу кардиомиоцитов на стресс. Угнетение функций hCPC доксорубином было подтверждено *in vivo* на животных моделях с антрациклиновой кардиомиопатией. В дополнение к этому использование hCPC после воздействия доксорубина не привело к структурному и функциональному восстановлению поврежденного субстрата и эффект от использования этих hCPC не был получен [28].

Существует рабочая гипотеза о том, что доксорубин оставляет специфическую клеточную «метку» в сердце, которая может существовать длительное время и раскрывает себя после латентного асимптоматического периода, вызывая в дальнейшем разрушительные последствия. При таком сценарии продолжительное повреждение спящих клеток-предшественников может расцениваться как носительство этой информации. Данная концепция была протестирована на мышах, которым вводился доксорубин сразу после рождения [25]. Во взрослом возрасте разницы в функции сердца не выявлено, и сердце леченных доксорубином мышей морфологически выглядело нормально – без дегенеративных изменений, свойственных доксорубининдуцированной кардиотоксичности. Однако ювенильное введение доксорубина приводило к снижению коронарного кровотока и плотности капиллярной сети, что явилось следствием угнетения

развития сосудов под влиянием доксорубина. Кроме того, сердце мышей, получивших доксорубин в детстве, оказалось более чувствительным к стрессу (физическая нагрузка, инфаркт миокарда), а также показало симптомы поздней кардиотоксичности. Выживаемость после инфаркта миокарда у этих мышей была ниже, и эти животные показали сниженную способность к неореваскуляризации, подтверждая факт более высокого риска ишемического повреждения после лечения доксорубином. Хотя инфаркт миокарда ассоциировался с миграцией клеток-предшественников в зону повреждения, в данном случае в пограничной зоне животных, получавших доксорубин в ювенильном периоде, было выявлено очень небольшое количество CPC. Это исследование также показало, что введение доксорубина в раннем возрасте влияет на дифференцировку CPC. Рост и развитие CPC, а также активность теломеразы были снижены, так как ингибитор клеточного цикла p16INK4a находился в состоянии апрегуляции. Поэтому ювенильное использование доксорубина даже в низких дозах индуцирует преждевременное старение и снижает количество резидентных CPC.

Возможность преждевременного старения кардиомиоцитов человека была подтверждена высокой фракцией p16INK4a-hCPC в миокарде пациентов, получавших лечение доксорубином, с сохранной функцией сердца, которые умерли от других осложнений химиотерапии [29]. В связи с тем, что ранняя и поздняя клеточная адаптация, которая встречается после лечения доксорубином, может отличаться, эволюция клеточного и молекулярного эффекта доксорубина на hCPC изучалась *in vitro*.

В раннем периоде после введения доксорубина отмечалось снижение жизнеспособности hCPC, индуцированное высоким уровнем апоптоза и возросшей экспрессией протеинов, повреждающих ДНК [29]. Увеличение γH2AX указывало на повреждение ДНК, в то время как фосфорилирование p53 указывало на активацию апоптоза [35]. В клеточных культурах hCPC после воздействия доксорубина раннее увеличение фосфорилирования p53 запускало отсроченную активацию апоптоза, в то время как экспрессия p16INK4a параллельно увеличивала активность SA-β-gal [29]. Подобные события наблюдались у пациентов в процессе или сразу после введения доксорубина. Однако после удаления доксорубина уровень гибели hCPC в результате апоптоза и повреждения ДНК вернулся к исходному. При отсутствии других стимулов старения в ряде случаев гипотетически hCPC могут восстановить свой пролиферативный потенциал [36]. Однако очень высокая фракция стареющих hCPC указывает, что данные клетки вошли в фазу необратимого прекращения роста в результате постоянной активации p16INK4a-Rb-пути [35, 37].

Хотя указанные процессы могут напрямую не приводить к сердечной недостаточности, они делают более уязвимым до этого здоровый миокард. Отсроченное начало кардиомиопатии у пациентов, уже имеющих субклиническое повреждение сердца в результате терапии доксорубицином, может индуцироваться дополнительными патологическими или физиологическими стрессами, такими как ишемия, острая вирусная инфекция, беременность, повышенная масса тела. Эти факторы могут трансформировать немую кардиомиопатию в развернутую сердечную недостаточность [38–40].

Кардиальные фибробласты

Накопление фиброзной ткани – одна из особенностей кардиомиопатии, провоцирующая некротическое повреждение кардиомиоцитов, – индуцирует провоспалительный ответ и образование чрезмерного количества активных форм кислорода. Образование активных форм кислорода, в свою очередь, является мощным стимулятором патологической продукции коллагена и активации трансформирующего фактора роста β (TGF- β), цитокина, ассоциированного с фибровоспалительным ответом [41–43]. Ряд исследователей отмечают, что доксорубицин существенно увеличивает уровень TGF- β и фосфорилированного SMAD3 совместно с отложением коллагена, а также усиливает фенотипическую трансформацию фибробластов в миофибробласты – клетки, которые синтезируют сократительные белки и профиброзные факторы [44]. Интересно, что кардиальные фибробласты, выделенные от крыс, получавших доксорубицин, имели повышенный уровень TGF- β и увеличенное соотношение фосфорилированного SMAD3Ser423/425/SMAD3. Дополнительно доксорубицин апрегулирует синтез основных компонентов экстрацеллюлярного матрикса – коллагена 1 типа и фибронектина [44]. Вышеуказанные исследования *in vivo* показали способность стимулировать профиброзную активность активированных кардиальных фибробластов. Наконец, в связи с тем, что фибробласты играют поддерживающую роль для CPC-клеток, потенциальное повреждение, вызванное доксорубицином, может спровоцировать дезорганизацию кардиальной структуры [45]. Биологическая роль взаимодействия миофибробластов и кардиальных стволовых клеток до конца неясна, хотя некоторые исследования показывают, что клетки-предшественники могут влиять на состав экстрацеллюлярного матрикса с помощью паракринной стимуляции [46].

Клетки сосудов сердца

С тех пор как в экспериментальных и клинических условиях был показан негативный эффект доксорубицина на клетки сосудов, большое внимание уделяется изучению состояния гладкомышечных и эндотелиальных клеток [47, 48]. Особенно в исследованиях *in vitro* изучался ответ гладкомышечных кле-

ток при лечении доксорубицином. Под воздействием доксорубицина клеточный цикл останавливался в фазе G2, что сопровождалось повышением концентрации маркеров повреждения и старения клеток. Интересно, что лечение доксорубицином уменьшало количество α -адренорецепторов и приводило к снижению сократительной способности гладкомышечных клеток в ответ на стимуляцию норэпинефрином [49].

ВЛИЯНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА НА ЭКСТРАКАРДИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ СО СВОЙСТВАМИ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

Как отмечалось ранее, ингибирование доксорубицином кардиальных клеток-предшественников, обладающих потенциалом саморегенерации, рассматривается как один из механизмов патогенеза кардиомиопатии. Вместе с тем экстракардиальные клетки-предшественники, такие как клетки костного мозга, должны быть рассмотрены для лучшего понимания патофизиологических механизмов кардиотоксичности, индуцируемой доксорубицином.

Эндотелиальные клетки-предшественники

Эндотелиальные клетки-предшественники (Endothelial progenitor cells, EPC), выделяемые из костного мозга в периферический кровоток, играют важную роль в постнатальном ангиогенезе [50]. Рекрутирование EPC было обнаружено при миокардиальном повреждении, вызванном доксорубицином, при изучении на животных моделях [51–53]. Кроме того, увеличение количества циркулирующих в периферическом кровотоке EPC было отмечено перед началом клинических проявлений кардиомиопатии и может рассматриваться в этой ситуации как предиктор кардиоваскулярного риска [54]. Интересно, что в экспериментах *in vitro* был отмечен дозозависимый эффект доксорубициновой токсичности в отношении EPC, в которых механизм апоптоза запускался высокими дозами, а преждевременное старение клеток вызывалось низкими дозами доксорубицина. Субтоксические дозы доксорубицина вызывали альтерацию в экспрессии некоторых протеинов, регулирующих клеточный цикл, синтез цитоскелета и структурных клеточных белков [55, 56]. Также было показано, что использование доксорубицина в субапоптозных дозах приводит к активации MAPKs, p38 и JNK, играющих важную роль в регуляции механизмов апоптоза и преждевременного старения клеток [56–58]. Механизмы, реализуемые через p38 и JNK, контролируют старение клеток, экспрессию p16INK4a и организацию цитоскелета EPC в условиях терапии доксорубицином [56]. Под воздействием доксорубицина в EPC происходит накопление активных форм кислорода, экспрессия p16INK4a и дисфункция теломер, приводя к даунрегуляции TRF2, что, в свою очередь, существенным образом угнетает процессы регенерации, стимулируемые EPC [59].

Клетки костного мозга

В нормальном состоянии появление клеток костного мозга (ВМС) в других органах ограничено, однако после повреждения тканей большое количество ВМС, индуцируемых гранулоцитколониестимулирующим фактором (G-CSF), стромальным фактором роста-1 и васкулярным эндотелиальным фактором роста, появляется в периферической крови [60, 61]. Также было показано, что в сердце человека могут появляться ВМС, таким образом формируя *de novo* кардиомиоциты и клетки коронарных сосудов уже во взрослой жизни [62, 63]. Экспериментальные модели также подтвердили возможность ВМС мигрировать из костного мозга в поврежденный после инфаркта миокард и играть определенную роль в процессе регенерации [64]. В одном из исследований доксорубициновой кардиотоксичности G-CSF использовался для стимуляции миграции ВМС в поврежденный миокард с целью ослабления негативного воздействия доксорубина на кардиальную дисфункцию. Стимуляция G-CSF увеличила миграцию ВМС в миокард, ослабив проявления кардиотоксичности, и улучшила выживаемость. Более того, флуоресцентно-меченые ВМС были выявлены интегрированными в миокард и обладали при этом миоцитоподобным фенотипом [65]. В тех случаях, когда протокол химиотерапии с использованием доксорубина не позволяет во времени восстановить гемопoэтическую систему и вызывает недостаточность функции костного мозга, отмечается снижение регенеративного потенциала ВМС и в других органах, включая сердце [66–68].

СТРАТЕГИЯ КАРДИОПРОТЕКЦИИ

Первым шагом кардиопротективной стратегии является снижение максимальной кумулятивной дозы доксорубина до 450 мг/м², хотя существуют данные о том, что это может не привести к существенному снижению случаев отсроченной доксорубиновой кардиомиопатии [69]. Поэтому в настоящее время не существует абсолютно безопасной дозировки доксорубина. Учитывая вышеизложенное, был предложен ряд других подходов в кардиопротекции при использовании доксорубина.

Одним из таких подходов является изменение характера введения доксорубина. Было показано, что медленная внутривенная инфузия, снижающая пиковую концентрацию препарата, не приводит к снижению противоопухолевой активности, при этом уменьшая проявления кардиотоксичности [70]. Использование пегилированной липосомальной формы доксорубина оказалось также эффективно в отношении опухолевых клеток, при этом была доказана связь со снижением кардиотоксических эффектов [71, 72].

Другим способом предотвращения кардиотоксичности является влияние на молекулярные и внутриклеточные механизмы, определяющие этот побочный эффект доксорубина. Декстразоксан – единственный препарат с доказанным кардиопротективным эффектом как в детском, так и во взрослом возрасте у пациентов, получающих терапию доксорубином [73, 74]. Декстразоксан действует как хелатирующий агент, вводящийся в железозависимые восстановительные реакции, снижая продукцию активных форм кислорода, которые повреждают внутриклеточные структуры [75]. В более поздних исследованиях было показано, что декстразоксан ингибирует ДНК-топоизомеразу II β , предотвращая ее связь с доксорубином и соответственно разрывы двуспиральной ДНК [76].

Также изучалось кардиопротективное использование веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, например таких, как пробукол, витамин E, L-карнитин, коэнзим Q10, глутатион и N-ацетилцистеин, однако и в клинической практике, и в экспериментах на моделях результаты оказались неоднозначными [77].

В настоящее время иАПФ, блокаторы рецепторов ангиотензина II, β -адреноблокаторы показали кардиопротективный эффект у пациентов, получающих терапию доксорубином [78, 79]. Учитывая тот факт, что вышеуказанные препараты относятся к разным классам, их кардиопротективное действие связано не только с β -блокирующим эффектом. Так, например, карведилол снижает продукцию активных форм кислорода у леченных доксорубином пациентов [80], в то время как небиволол предотвращает разобщение пероксинитрита и NO-синтазы [81]. Обобщая вышеуказанные данные, можно сделать вывод, что кардиопротекторы напрямую или опосредованно влияют на синтез активных форм кислорода и оксидативный стресс в условиях терапии доксорубином, однако это в полной мере не может решить вопрос доксорубиновой кардиотоксичности [82].

В одном из исследований было показано, что, кроме фармакологических методов профилактики кардиотоксических эффектов антрациклинов, физическая нагрузка перед началом химиотерапии доксорубином снижает последующий его кардиотоксический эффект. Аэробная нагрузка у половозрелых мышей, получавших доксорубин, снижала его концентрацию в митохондриях и увеличивала экспрессию локализованного в митохондриях АТФ-связанного кассетного транспортного протеина, таким образом вызывая апрегуляцию митохондриальных транспортных белков, ответственных за экспорт доксорубина из митохондрий кардиомиоцитов, что существенным образом снижало кардиотоксический эффект [83].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре приведены аспекты патофизиологии, связанные с влиянием доксорубина на кардиальные клетки-предшественники, кардиальные фибробласты, клетки сосудов сердца и на экстракардиальные клетки со свойствами клеток-предшественников (эндотелиальные клетки-предшественники и клетки костного мозга). Также в текущем литературном обзоре рассматриваются вопросы стратегии кардиопротекции.

В первой части обзора показано, что доксорубин вызывает прямые изменения в системе окислительного фосфорилирования митохондрий, как результат окислительного стресса, приводящего к ядерно-опосредованным эффектам лекарственного препарата с изменением экспрессии генов [1]. Вышеперечисленные процессы приводят к каскадному повреждению клеток и изменению потоков митофагии или аутофагии [84, 85]. Также известно, что и другие клетки сердца, например кардиальные фибробласты, клетки эндотелия, клетки гладкой мускулатуры сосудов сердца, являются объектами повреждения доксорубина.

Более того, экстракардиальные недифференцированные клетки, вовлеченные в поддержание гомеостаза кардиомиоцитов, также подвергаются негативному воздействию доксорубина.

Кумулятивный характер патофизиологических процессов в организме онкологических больных на фоне или после окончания терапии доксорубином является самой большой проблемой в мире. Обзор научной литературы отвечает на вопросы: «У кого могут развиваться структурные изменения сердца, характерные для кардиомиопатии?» и «Сколько времени пройдет до первых нозологических признаков?».

В силу такого широкого спектра негативных влияний доксорубина начиная с 70-х годов XX столетия разрабатываются и модифицируются стратегии профилактики и лечения доксорубиновой кардиомиопатии. В качестве одного из механизмов защиты предлагается снижение максимальной кумулятивной дозы до 450 мг/м², что может быть первым шагом, хотя само по себе это не гарантирует полной защиты. Дополнительно возможно изменение характера введения доксорубина, как, например, использование медленной внутривенной инфузии, которая может снизить этот риск, сохраняя при этом эффективность противоопухолевого действия препарата. Модификация как дозы, так и скорости введения доксорубина, приводит к положительному эффекту вследствие статистически более вероятной гибели опухолевых клеток за счет их большей чувствительности к химиопрепарату, а также различий в характере распределения доксорубина в органах и тканях при снижении максимальной концент-

рации препарата в крови. Также снижение кардиотоксичности может достигаться при использовании липосомальных форм препарата. Оценка их профиля безопасности проведена в ходе многоцентровых исследований, а положенный в основание механизм действия также проявляется в статистическом различии вероятности поглощения молекул химиотерапевтического агента клетками и изменения параметров его распределения в тканях организма.

Следующий вариант стратегии кардиопротекции заключается в применении средств, повышающих устойчивость кардиомиоцитов к токсическому действию доксорубина, например декстразоксана – препарата с доказанным кардиопротективным эффектом, который действует как хелатирующий агент и ингибирует ДНК-топоизомеразу IIβ. Использование различных кардиопротекторов (пробукол, витамин E, L-карнитин, коэнзим Q10, глутатион и N-ацетилцистеин), препаратов для лечения хронической сердечной недостаточности (ИАПФ, блокаторы рецепторов ангиотензина II, β-адреноблокаторы) направлено на модификацию биохимических процессов в клетке и представляет альтернативную ветку развития кардиопротективной стратегии, но результаты их применения требуют дополнительного исследования для установления эффективности в клинической практике [1, 86, 87].

И, пожалуй, как отдельное направление стоит отметить использование немедикаментозных методов, таких как регулярная аэробная нагрузка перед началом химиотерапии, изменяющая метаболизм кардиомиоцитов путем регуляции экспрессии митохондриальных транспортных белков. Данный метод может быть рассмотрен как дополнительный в комплексном подходе к защите сердечно-сосудистой системы при проведении химиотерапии [87].

Таким образом, представленные стратегии направлены на различные механизмы, позволяющие обеспечить снижение кардиотоксичности доксорубина, и подчеркивают необходимость комплексного подхода для достижения наилучших результатов в защите сердечно-сосудистой системы пациентов, получающих данную терапию.

Остаются нерешенными вопросы, «когда» и «как» использовать кардиопротекторы, чтобы улучшить и сохранить функциональную активность сердечно-сосудистой системы. Ответы на них предоставят возможность расширить показания к применению антирадикальных химиопрепаратов в онкологической практике.

Однако несмотря на огромное количество научных работ, посвященных различным аспектам кардиотоксичности доксорубина, данная проблема требует более тщательного изучения и выработки более совершенных методов ранней диагностики, профилактики и более эффективной терапии [1].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Andreev D. A., Balakin E. I., Samoilov A. S., Pustovoi V. I. The Role of Doxorubicin in the Formation of Cardiotoxicity – Generally Accepted Statement. Part I. Prevalence and Mechanisms of Formation (Review). *Drug development & registration*. 2024;13(1):190–199. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-1-1508.
- Wallace K. B., Sardão V. A., Oliveira P. J. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Circulation Research*. 2020;126(7):926–941. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314681.
- Lefrak E. A., Pitha J., Rosenheim S., Gottlieb J. A. A clinico-pathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*. 1973;32(2):302–314. DOI: 10.1002/1097-0142(197308)32:2<302::aid-cnrcr2820320205>3.0.co;2-2.
- Swain S. M., Whaley F. S., Ewer M. S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin. *Cancer*. 2003;97(11):2869–2879. DOI: 10.1002/cncr.11407.
- Arai M., Yoguchi A., Takizawa T., Yokoyama T., Kanda T., Kurabayashi M., Nagai R. Mechanism of doxorubicin-induced inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene transcription. *Circulation Research*. 2000;86(1):8–14. DOI: 10.1161/01.res.86.1.8.
- Steinherz L. J., Steinherz P. G., Tan C. T., Heller G., Murphy M. L. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA*. 1991;266(12):1672–1677.
- Maksjutov N. F., Murtazin A. A., Balakin E. I., Pustovoi V. I. Using machine learning approaches and omics technologies for assessment of human functional state. *Modern Issues of Biomedicine*. 2022;6(3). (In Russ.) DOI: 10.51871/2588-0500_2022_06_03_14.
- Cardinale D., Colombo A., Bacchiani G., Tedeschi I., Meroi C. A., Veglia F., Civelli M., Lamantia G., Colombo N., Curigliano G., Fiorentini C., Cipolla C. M. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation*. 2015;131(22):1981–1988. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777.
- Pustovoi V. I., Balakin E. I., Maksjutov N. F., Murtazin A. A., Samoylov A. S. Change in the functional status of extreme athletes in response to adverse environmental conditions. *Human sport medicine*. 2022;22(S2):22–29. DOI: 10.14529/hsm22s203.
- Jordan J. H., Castellino S. M., Meléndez G. C., Klepin H. D., Ellis L. R., Lamar Z., Vasu S., Kitzman D. W., Ntim W. O., Brubaker P. H., Reichel N., D'Agostino R. B., Hundley W. G. Left Ventricular Mass Change After Anthracycline Chemotherapy. *Circulation: Heart Failure*. 2018;11(7):e004560. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004560.
- Willis M. S., Parry T. L., Brown D. I., Mota R. I., Huang W., Beak J. Y., Sola M., Zhou C., Hicks S. T., Caughey M. C., D'Agostino R. B., Jordan J., Hundley W. G., Jensen B. C. Doxorubicin Exposure Causes Subacute Cardiac Atrophy Dependent on the Striated Muscle-Specific Ubiquitin Ligase MuRF1. *Circulation: Heart Failure*. 2019;12(3):e005234. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005234.
- Kajihara H., Yokozaki H., Yamahara M., Kadomoto Y., Tahara E. Anthracycline induced myocardial damage: An analysis of 16 autopsy cases. *Pathology – Research and Practice*. 1986;181(4):434–441. DOI: 10.1016/S0344-0338(86)80079-6.
- Prezioso L., Tanzi S., Galaverna F., Frati C., Testa B., Savi M., Graiani G., Lagrasta C., Cavalli S., Galati S., Madeddu D., Rizzini E., Ferraro F., Musso E., Stilli D., Urbanek K., Piegari E., De Angelis A., Maseri A., Rossi F., Quaini F. Cancer Treatment-Induced Cardiotoxicity: a Cardiac Stem Cell Disease? *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. 2010;8(1):55–75. DOI: 10.2174/187152510790796165.
- Bearzi C., Rota M., Hosoda T., Tillmanns J., Nascimbene A., De Angelis A., Yasuzawa-Amano S., Trofimova I., Siggins R. W., LeCapitaine N., Cascapera S., Beltrami A. P., D'Alessandro D. A., Zias E., Quaini F., Urbanek K., Michler R. E., Bolli R., Kajstura J., Leri A., Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(35):14068–14073. DOI: 10.1073/pnas.0706760104.
- Beltrami A. P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763–776. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00687-1.
- Pfister O., Mouquet F., Jain M., Summer R., Helmes M., Fine A., Colucci W. S., Liao R. CD31⁺ but Not CD31⁺ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circulation Research*. 2005;97(1):52–61. DOI: 10.1161/01.RES.0000173297.53793.f.
- Smith R. R., Barile L., Cho H. C., Leppo M. K., Hare J. M., Messina E., Giacomello A., Abraham M. R., Marbán E. Regenerative potential of cardiophere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115(7):896–908. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655209.
- Cesselli D., Beltrami A. P., D'Aurizio F., Marcon P., Bergamin N., Toffoletto B., Pandolfi M., Puppato E., Marino L., Signore S., Livi U., Verardo R., Piazza S., Marchionni L., Fiorini C., Schneider C., Hosoda T., Rota M., Kajstura J., Anversa P., Beltrami C. A., Leri A. Effects of age and heart failure on human cardiac stem cell function. *The American Journal of Pathology*. 2011;179(1):349–366. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.03.036.
- Chimenti C., Kajstura J., Torella D., Urbanek K., Heleniak H., Colussi C., Di Meglio F., Nadal-Ginard B., Frustaci A., Leri A., Maseri A., Anversa P. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. *Circulation Research*. 2003;93(7):604–613. DOI: 10.1161/01.RES.0000093985.76901.AF.
- Rota M., LeCapitaine N., Hosoda T., Boni A., De Angelis A., Padin-Iruelas M. E., Esposito G., Vitale S., Urbanek K., Casarsa C., Giorgio M., Lüscher T. F., Pellicci P. G., Anversa P., Leri A., Kajstura J. Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66^{shc} gene. *Circulation Research*. 2006;99(1):42–52. DOI: 10.1161/01.RES.0000231289.63468.08.
- Rupp S., Bauer J., von Gerlach S., Fichtlscherer S., Zeiher A. M., Dimmeler S., Schranz D. Pressure overload leads to an increase of cardiac resident stem cells. *Basic Research in Cardiology*. 2012;107(2):252. DOI: 10.1007/s00395-012-0252-x.

22. Urbanek K., Torella D., Sheikh F., De Angelis A., Nurzynska D., Silvestri F., Beltrami C. A., Bussani R., Beltrami A. P., Quaini F., Bolli R., Leri A., Kajstura J., Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(24):8692–8697. DOI: 10.1073/pnas.0500169102.
23. Avolio E., Gianfranceschi G., Cesselli D., Caragnano A., Athanasakis E., Katare R., Meloni M., Palma A., Barchiesi A., Vascotto C., Toffoletto B., Mazzega E., Finato N., Aresu G., Livi U., Emanueli C., Scoles G., Beltrami C. A., Madeddu P., Beltrami A. P. Ex vivo molecular rejuvenation improves the therapeutic activity of senescent human cardiac stem cells in a mouse model of myocardial infarction. *Stem Cells*. 2014;32(9):2373–2385. DOI: 10.1002/stem.1728.
24. Kajstura J., Gurusamy N., Ogórek B., Goichberg P., Clavo-Rondon C., Hosoda T., D'Amario D., Bardelli S., Beltrami A. P., Cesselli D., Bussani R., del Monte F., Quaini F., Rota M., Beltrami C. A., Buchholz B. A., Leri A., Anversa P. Myocyte Turnover in the Aging Human Heart. *Circulation Research*. 2010;107(11):1374–1386. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.231498.
25. Huang C., Zhang X., Ramil J. M., Rikka S., Kim L., Lee Y., Gude N. A., Thistlethwaite P. A., Sussman M. A., Gottlieb R. A., Gustafsson Å. B. Juvenile exposure to anthracyclines impairs cardiac progenitor cell function and vascularization resulting in greater susceptibility to stress-induced myocardial injury in adult mice. *Circulation*. 2010;121(5):675–683. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.902221.
26. De Angelis A., Piegari E., Cappetta D., Marino L., Filippelli A., Berrino L., Ferreira-Martins J., Zheng H., Hosoda T., Rota M., Urbanek K., Kajstura J., Leri A., Rossi F., Anversa P. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function. *Circulation*. 2010;121(2):276–292. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.895771.
27. Piegari E., De Angelis A., Cappetta D., Russo R., Esposito G., Costantino S., Graiani G., Frati C., Prezioso L., Berrino L., Urbanek K., Quaini F., Rossi F. Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells. *Basic Research in Cardiology*. 2013;108(2):334. DOI: 10.1007/s00395-013-0334-4.
28. De Angelis A., Piegari E., Cappetta D., Russo R., Esposito G., Ciuffreda L. P., Ferraiolo F. A. V., Frati C., Fagnoni F., Berrino L., Quaini F., Rossi F., Urbanek K. SIRT1 activation rescues doxorubicin-induced loss of functional competence of human cardiac progenitor cells. *International Journal of Cardiology*. 2015;189:30–44. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.03.438.
29. Piegari E., De Angelis A., Cappetta D., Russo R., Esposito G., Costantino S., Graiani G., Frati C., Prezioso L., Berrino L., Urbanek K., Quaini F., Rossi F. Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells. *Basic Research in Cardiology*. 2013;108(2):334. DOI: 10.1007/s00395-013-0334-4.
30. Cesselli D., Beltrami A. P., D'Aurizio F., Marcon P., Bergamin N., Toffoletto B., Pandolfi M., Puppato E., Marino L., Signore S., Livi U., Verardo R., Piazza S., Marchionni L., Fiorini C., Schneider C., Hosoda T., Rota M., Kajstura J., Anversa P., Beltrami C. A., Leri A. Effects of age and heart failure on human cardiac stem cell function. *The American Journal of Pathology*. 2011;179(1):349–366. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.03.036.
31. Linke A., Müller P., Nurzynska D., Casarsa C., Torella D., Nascimbene A., Castaldo C., Cascapera S., Böhm M., Quaini F., Urbanek K., Leri A., Hintze T. H., Kajstura J., Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(25):8966–8971. DOI: 10.1073/pnas.0502678102.
32. Torella D., Rota M., Nurzynska D., Musso E., Monsen A., Shiraishi I., Zias E., Walsh K., Rosenzweig A., Sussman M. A., Urbanek K., Nadal-Ginard B., Kajstura J., Anversa P., Leri A. Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circulation Research*. 2004;94(4):514–524. DOI: 10.1161/01.RES.0000117306.10142.50.
33. Urbanek K., Rota M., Cascapera S., Bearzi C., Nascimbene A., De Angelis A., Hosoda T., Chimenti S., Baker M., Limana F., Nurzynska D., Torella D., Rotatori F., Rastaldo R., Musso E., Quaini F., Leri A., Kajstura J., Anversa P. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circulation Research*. 2005;97(7):663–673. DOI: 10.1161/01.RES.0000183733.53101.11.
34. Powell E. M., Mars W. M., Levitt P. Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Is a Motogen for Interneurons Migrating from the Ventral to Dorsal Telencephalon. *Neuron*. 2001;30(1):79–89. DOI: 10.1016/S0896-6273(01)00264-1.
35. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005;120(4):513–522. DOI: 10.1016/j.cell.2005.02.003.
36. Beauséjour C. M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S. W., Yaswen P., Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO Journal*. 2003;22(16):4212–4222. DOI: 10.1093/emboj/cdg417.
37. Takai H., Smogorzewska A., de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Current Biology*. 2003;13(17):1549–1556. DOI: 10.1016/s0960-9822(03)00542-6.
38. Ali M. K., Ewer M. S., Gibbs H. R., Swafford J., Graff K. L. Late doxorubicin-associated cardiotoxicity in children. *Cancer*. 1994;74(1):182–188. DOI: 10.1002/1097-0142(19940701)74:1<182::aid-cnrc2820740129>3.0.co;2-2.
39. Chen M. H., Colan S. D., Diller L. Cardiovascular disease: cause of morbidity and mortality in adult survivors of childhood cancers. *Circulation Research*. 2011;108(5):619–628. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.224519.
40. Pai V. B., Nahata M. C. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Safety*. 2000;22(4):263–302. DOI: 10.2165/00002018-200022040-00002.
41. Kuwahara F., Kai H., Tokuda K., Kai M., Takeshita A., Egashira K., Imaizumi T. Transforming growth factor-β function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation*. 2002;106(1):130–135. DOI: 10.1161/01.cir.0000020689.12472.e0.
42. Krstić J., Trivanović D., Mojsilović S., Santibanez J. F. Transforming Growth Factor-Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015;2015:654594. DOI: 10.1155/2015/654594.

43. Li A.-H., Liu P. P., Villarreal F. J., Garcia R. A. Dynamic changes in myocardial matrix and relevance to disease: translational perspectives. *Circulation Research*. 2014;114(5):916–927. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302819.
44. Cappetta D., Esposito G., Piegari E., Russo R., Ciuffreda L. P., Rivellino A., Berrino L., Rossi F., De Angelis A., Urbanek K. SIRT1 activation attenuates diastolic dysfunction by reducing cardiac fibrosis in a model of anthracycline cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*. 2016;205:99–110. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.12.008.
45. Urbanek K., Cesselli D., Rota M., Nascimbene A., De Angelis A., Hosoda T., Bearzi C., Boni A., Bolli R., Kajstura J., Anversa P., Leri A. Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(24):9226–9231. DOI: 10.1073/pnas.0600635103.
46. Ramkisoensing A. A., de Vries A. A. F., Atsma D. E., Schallij M. J., Pijnappels D. A. Interaction between myofibroblasts and stem cells in the fibrotic heart: balancing between deterioration and regeneration. *Cardiovascular Research*. 2014;102(2):224–231. DOI: 10.1093/cvr/cvu047.
47. Soultati A., Mountzios G., Avgerinou C., Papaxoinis G., Pectasides D., Dimopoulos M.-A., Papadimitriou C. Endothelial vascular toxicity from chemotherapeutic agents: Preclinical evidence and clinical implications. *Cancer Treatment Reviews*. 2012;38(5):473–483. DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.09.002.
48. Bielak-Zmijewska A., Wnuk M., Przybylska D., Grabowska W., Lewinska A., Alster O., Korwek Z., Cmoch A., Myszyńska A., Pikula S., Mosieniak G., Sikora E. A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta. *Biogerontology*. 2014;15(1):47–64. DOI: 10.1007/s10522-013-9477-9.
49. Murata T., Yamawaki H., Hori M., Sato K., Ozaki H., Karaki H. Chronic vascular toxicity of doxorubicin in an organ-cultured artery. *British Journal of Pharmacology*. 2001;132(7):1365–1373. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703959.
50. Urbich C., Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation Research*. 2004;95(4):343–353. DOI: 10.1161/01.RES.0000137877.89448.78.
51. Rafii S., Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature Medicine*. 2003;9(6):702–712. DOI: 10.1038/nm0603-702.
52. Hamed S., Barshack I., Luboshits G., Wexler D., Deutsch V., Keren G., George J. Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *European Heart Journal*. 2006;27(15):1876–1883. DOI: 10.1093/eurheartj/ehl044.
53. Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J. M., Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine*. 1999;5(4):434–438. DOI: 10.1038/7434.
54. Hill J. M., Zalos G., Halcox J. P. J., Schenke W. H., Waclawiw M. A., Quyyumi A. A., Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(7):593–600. DOI: 10.1056/NEJMoa022287.
55. Maejima Y., Adachi S., Ito H., Hirao K., Isobe M. Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell*. 2008;7(2):125–136. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2007.00358.x.
56. Spallarossa P., Altieri P., Barisione C., Passalacqua M., Aloï C., Fugazza G., Frassoni F., Podestà M., Canepa M., Ghigliotti G., Brunelli C. p38 MAPK and JNK antagonistically control senescence and cytoplasmic p16INK4A expression in doxorubicin-treated endothelial progenitor cells. *PLoS ONE*. 2010;5(12):e15583. DOI: 10.1371/journal.pone.0015583.
57. Wada T., Stepniak E., Hui L., Leibbrandt A., Katada T., Nishina H., Wagner E. F., Penninger J. M. Antagonistic control of cell fates by JNK and p38-MAPK signaling. *Cell Death & Differentiation*. 2008;15(1):89–93. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402222.
58. Spallarossa P., Altieri P., Pronzato P., Aloï C., Ghigliotti G., Barsotti A., Brunelli C. Sublethal doses of an anti-erbB2 antibody leads to death by apoptosis in cardiomyocytes sensitized by low pro-senescent doses of epirubicin: the protective role of dexrazoxane. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010;332(1):87–96. DOI: 10.1124/jpet.109.159525.
59. Yasuda K., Park H.-C., Ratliff B., Addabbo F., Hatzopoulos A. K., Chander P., Goligorsky M. S. Adriamycin nephropathy: a failure of endothelial progenitor cell-induced repair. *The American Journal of Pathology*. 2010;176(4):1685–1695. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091071.
60. Moore M. A. S., Hattori K., Heissig B., Shieh J.-H., Dias S., Crystal R. G., Rafii S. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;938(1):36–47. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03572.x.
61. McNiece I. K., Briddell R. A., Hartley C. A., Smith K. A., Andrews R. G. Stem cell factor enhances in vivo effects of granulocyte colony stimulating factor for stimulating mobilization of peripheral blood progenitor cells. *STEM CELLS*. 1993;11(S2):36–41. DOI: 10.1002/stem.5530110807.
62. Quaini F., Urbanek K., Beltrami A. P., Finato N., Beltrami C. A., Nadal-Ginard B., Kajstura J., Leri A., Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(1):5–15. DOI: 10.1056/NEJMoa012081.
63. Thiele J., Varus E., Wickenhauser C., Kvasnicka H. M., Metz K. A., Beelen D. W. Regeneration of heart muscle tissue: quantification of chimeric cardiomyocytes and endothelial cells following transplantation. *Histol Histopathol*. 2004;19(1):201–209. DOI: 10.14670/HH-19.201.
64. Fukuhara S., Tomita S., Nakatani T., Ohtsu Y., Ishida M., Yutani C., Kitamura S. G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. *Cell Transplantation*. 2004;13(7–8):741–748. DOI: 10.3727/000000004783983486.
65. Tomita S., Ishida M., Nakatani T., Fukuhara S., Hisashi Y., Ohtsu Y., Suga M., Yutani C., Yagihara T., Yamada K., Kitamura S. Bone marrow is a source of regenerated cardiomyocytes in doxorubicin-induced cardiomyopathy and granulocyte colony-stimulating factor enhances migration of bone marrow cells and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin under electron microscopy. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2004;23(5):577–584. DOI: 10.1016/j.healun.2003.06.001.

66. Urbanek K., Frati C., Graiani G., Madeddu D., Falco A., Cavalli S., Lorusso B., Gervasi A., Prezioso L., Savi M., Ferraro F., Galaverna F., Rossetti P., Lagrasta C., Re F., Quaini E., Rossi F., Angelis A., Quaini F. Cardioprotection by Targeting the Pool of Resident and Extracardiac Progenitors. *Current Drug Targets*. 2015;16(8):884–894. DOI: 10.2174/1389450116666150126105002.
67. Yang F., Chen H., Liu Y., Yin K., Wang Y., Li X., Wang G., Wang S., Tan X., Xu C., Lu Y., Cai B. Doxorubicin caused apoptosis of mesenchymal stem cells via p38, JNK and p53 pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2013;32(4):1072–1082. DOI: 10.1159/000354507.
68. Oliveira M.S., Carvalho J.L., De Angelis Campos A.C., Gomes D.A., de Goes A.M., Melo M.M. Doxorubicin has in vivo toxicological effects on ex vivo cultured mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters*. 2014;224(3):380–386. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.11.023.
69. Lipshultz S.E., Lipsitz S.R., Sallan S.E., Dalton V.M., Mone S.M., Gelber R.D., Colan S.D. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(12):2629–2636. DOI: 10.1200/JCO.2005.12.121.
70. Legha S.S., Benjamin R.S., Mackay B., Yap H.Y., Wallace S., Ewer M., Blumenschein G.R., Freireich E.J. Adriamycin therapy by continuous intravenous infusion in patients with metastatic breast cancer. *Cancer*. 1982;49(9):1762–1766. DOI: 10.1002/1097-0142(19820501)49:9<1762::aid-cnrc2820490905>3.0.co;2-q.
71. Batist G. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Cardiovascular Toxicology*. 2007;7(2):72–74. DOI: 10.1007/s12012-007-0014-4.
72. Van Dalen E.C., Michiels E.M.C., Caron H.N., Kremer L.C.M. Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010;(3):CD005006. DOI: 10.1002/14651858.CD005006.pub3.
73. Lipshultz S.E., Scully R.E., Lipsitz S.R., Sallan S.E., Silverman L.B., Miller T.L., Barry E.V., Asselin B.L., Athale U., Clavell L.A., Larsen E., Moghrabi A., Samson Y., Michon B., Schorin M.A., Cohen H.J., Neuberg D.S., Orav E.J., Colan S.D. Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11(10):950–961. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70204-7.
74. Speyer J.L., Green M.D., Zeleniuch-Jacquotte A., Wernz J.C., Rey M., Sanger J., Kramer E., Ferrans V., Hochster H., Meyers M. ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1992;10(1):117–127. DOI: 10.1200/JCO.1992.10.1.117.
75. Hochster H.S. Clinical pharmacology of dexrazoxane. *Seminars in Oncology*. 1998;25(4 Suppl 10):37–42.
76. Lyu Y.L., Kerrigan J.E., Lin C.-P., Azarova A.M., Tsai Y.-C., Ban Y., Liu L.F. Topoisomerase II β -Mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Research*. 2007;67(18):8839–8846. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1649.
77. Ladas E.J., Jacobson J.S., Kennedy D.D., Teel K., Fleischauer A., Kelly K.M. Antioxidants and cancer therapy: a systematic review. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(3):517–528. DOI: 10.1200/JCO.2004.03.086.
78. Kalay N., Basar E., Ozdogru I., Er O., Cetinkaya Y., Dogan A., Oguzhan A., Eryol N.K., Topsakal R., Ergin A., Inanc T. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(11):2258–2262. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.07.052.
79. Kaya M. G., Ozkan M., Gunebakmaz O., Akkaya H., Kaya E. G., Akpek M., Kalay N., Dikilitas M., Yarlioglues M., Karaca H., Berk V., Ardic I., Ergin A., Lam Y. Y. Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: a randomized control study. *International Journal of Cardiology*. 2013;167(5):2306–2310. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.06.023.
80. Spallarossa P., Garibaldi S., Altieri P., Fabbi P., Manca V., Nasti S., Rossettin P., Ghigliotti G., Ballestrero A., Patrone F. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2004;37(4):837–846. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2004.05.024.
81. Mason R.P., Kalinowski L., Jacob R.F., Jacoby A.M., Malinski T. Nebivolol reduces nitroxidative stress and restores nitric oxide bioavailability in endothelium of black Americans. *Circulation*. 2005;112(24):3795–3801. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.556233.
82. Singal P., Li T., Kumar D., Danelisen I., Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2000;207(1–2):77–86. DOI: 10.1023/a:1007094214460.
83. Ascensão A., Magalhães J., Soares J.M.C., Ferreira R., Neuparth M.J., Marques F., Oliveira P.J., Duarte J.A. Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(2):H722–H731. DOI: 10.1152/ajpheart.01249.2004.
84. Foote K., Reinhold J., Yu E.P.K., Figg N.L., Finigan A., Murphy M.P., Bennett M.R. Restoring mitochondrial DNA copy number preserves mitochondrial function and delays vascular aging in mice. *Aging Cell*. 2018;17(4):e12773. DOI: 10.1111/acer.12773.
85. Yue P., Jing S., Liu L., Ma F., Zhang Y., Wang C., Duan H., Zhou K., Hua Y., Wu G., Li Y. Association between mitochondrial DNA copy number and cardiovascular disease: Current evidence based on a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*. 2018;13(11):e0206003. DOI: 10.1371/journal.pone.0206003.
86. Pustovoi V.I. Database of methods for complex nutritional-metabolic correction of the functional state of an athlete's body under extreme loads. RF patent for invention. Patent RUS № RU 2022622848. 11.11.2022. Available at: <https://istina.msu.ru/patents/510751941/> Accessed: 29.01.2024.
87. Pustovoi V.I., Balakin E.I., Khan A.V., Murtazin A.A., Maksjutov N.F., Merkulova P.S., Kubyshev K.A. The combination of traditional cardiorespiratory markers during treadmill testing "to failure" in athletes, depending on professional activity. *Sports medicine: research and practice*. 2022;12(3):51–59. (In Russ.) DOI: 10.47529/2223-2524.2022.3.5.



Разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме лабораторных животных

И. И. Яичков^{1, 2}✉, М. К. Корсаков¹, А. А. Шетнев¹, Н. Н. Вольхин¹, С. С. Петухов^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского». Центр трансфера фармацевтических технологий им. М. В. Дорогова. 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108/1

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России). 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

✉ Контактное лицо: Яичков Илья Игоревич. E-mail: iyaichkov@yspu.org

ORCID: И. И. Яичков – <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>;

М. К. Корсаков – <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>;

А. А. Шетнев – <https://orcid.org/0000-0002-4389-461X>;

Н. Н. Вольхин – <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>;

С. С. Петухов – <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>.

Статья поступила: 27.02.2024

Статья принята в печать: 27.08.2024

Статья опубликована: 28.08.2024

Резюме

Введение. Изучение системной экспозиции нового оригинального лекарственного препарата является обязательным этапом его доклинического исследования. 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид является новым селективным ингибитором карбоангидразы II для лечения открытоугольной глаукомы. Методики количественного определения данного соединения и его N-гидрокси- и N-ацетилметаболитов в плазме лабораторных животных ранее разработаны не были.

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M_1) и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M_2) в плазме крови крысы и кролика методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы. Для пробоподготовки применялось осаждение белков метанолом. В качестве внутреннего стандарта использован 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид. К пробам плазмы добавлялся 5%-й водный раствор аскорбиновой кислоты в объемном соотношении 1:2 для предотвращения разложения N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида. В качестве антикоагулянта выбрана комбинация натрия фторида и калия оксалата. Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax Eclipse Plus C18 (150 × 3,0 мм, 3,5 мкм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 (12,5 × 2,1 мм, 5,0 мкм) с применением подвижной фазы на основе 0,1%-го водного раствора муравьиной кислоты и метанола. Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме MRM с использованием электрораспылительной ионизации в отрицательной полярности. Апробацию методики проводили во время фармакокинетического исследования 1%-й глазной суспензии 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида на 6 крысах линии Wistar. Образцы крови отбирали до введения, а также спустя 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 144 ч, 216 ч после введения. Некомпарментный подход использовался для расчета фармакокинетических параметров.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика прошла валидацию по показателям «селективность», «калибровочная кривая», «правильность и прецизионность», «эффект матрицы», «эффект разведения», «эффект переноса из предыдущей пробы», «воспроизводимость при повторном введении серии», «стабильность». Аналитический диапазон определения в плазме 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида составил 10–4000 нг/мл, M_1 – 1,0–400,0 нг/мл, M_2 – 0,1–40,0 нг/мл. Выбранная комбинация антикоагулянта и раствора стабилизатора позволяет хранить образцы плазмы в течение 28 дней в морозильной камере.

Заключение. Разработанная методика в ходе проведенной валидации подтвердила свою пригодность для количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме крови лабораторных животных. Данная методика успешно использована при исследовании фармакокинетики 1%-й глазной суспензии изучаемого препарата.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС, плазма, стабилизация, валидация, фармакокинетика, ингибитор карбоангидразы II, N-гидроксисульфонамид

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

Вклад авторов. И. И. Яичков проводил разработку и валидацию биоаналитической методики, анализ образцов животных. М. К. Корсаков, А. А. Шетнев отвечали за формулирование целей и задач, организационную часть исследования. Н. Н. Вольхин, С. С. Петухов отвечали за работу с лабораторными животными.

Финансирование. Статья подготовлена в рамках Государственного задания Ярославского государственного педагогического университета им. К. Д. Ушинского на 2024 год от Минпросвещения России по теме «Разработка нового лекарственного средства для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе ингибитора моноаминоксидазы» (номер реестровой записи 720000Ф.99.1.БН62АА12000).

Для цитирования: Яичков И. И., Корсаков М. К., Шетнев А. А., Вольхин Н. Н., Петухов С. С. Разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме лабораторных животных. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):219–230. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1771>

Development and validation of the method of quantification of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in laboratory animal plasma

Ilya I. Yaichkov^{1,2✉}, Mikhail K. Korsakov¹, Anton A. Shetnev¹, Nikita N. Volkhin¹, Sergey S. Petukhov^{1,2}

¹ Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky. M. V. Dorogov Pharmaceutical Technology Transfer Center. 108/1, Respublikanskaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Yaroslavl State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 5, Revolutsionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

✉ **Corresponding author:** Ilya I. Yaichkov. **E-mail:** i.yaichkov@yspu.org

ORCID: Ilya I. Yaichkov – <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>;
Mikhail K. Korsakov – <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>;
Anton A. Shetnev – <https://orcid.org/0000-0002-4389-461X>;
Nikita N. Volkhin – <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>;
Sergey S. Petukhov – <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>.

Received: 27.02.2024

Accepted: 27.08.2024

Published: 28.08.2024

Abstract

Introduction. The study of the systemic exposure of a new original drug is an essential part of its preclinical study. 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide is a new selective carbonic anhydrase II inhibitor for the treatment of open-angle glaucoma. Methods for the quantitative determination of this compound and its N-hydroxy- and N-acetyl metabolites in the plasma of laboratory animals have not been previously developed.

Aim. Development and validation of a method of quantitative determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (M_1) and N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (M_2) in rat and rabbit blood plasma by HPLC-MS/MS.

Materials and methods. Protein precipitation by methanol was applied for sample preparation. 5-[2-(morpholine-4-carbonyl)-1,3-oxazole-5-yl]-thiophene-2-sulfonamide was used as an internal standard. A 5 % aqueous solution of ascorbic acid was added to the plasma samples at volume ratio 1:2 to prevent decomposition of N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide. The combination of sodium fluoride and potassium oxalate was selected as an anticoagulant. Chromatographic separation was performed on Zorbax Eclipse Plus C18 column (150 × 3.0 mm, 3.5 μm) with Zorbax Eclipse Plus C18 pre-column (12.5 × 2.1 mm, 5.0 μm) using a mobile phase based on a 0.1 % aqueous solution of formic acid and methanol. Mass spectrometric detection was carried out in the MRM mode using electrospray ionization in negative polarity. The method was tested during a pharmacokinetic study of a 1 % ocular suspension of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide on 6 Wistar rats. Blood samples were collected before administration, as well as 30 min, 1 h, 1 h 30 min, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 144 h, 216 h after administration. The non-compartment approach was used for calculation pharmacokinetic parameters.

Results and discussion. The developed method has been validated in parameters of selectivity, calibration curve, accuracy and precision, matrix effect, dilution integrity, carry over, reinjection reproducibility, stability. The analytical range of determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide in plasma was 10–4000 ng/ml, M_1 – 1.0–400.0 ng/ml, M_2 – 0.1–40.0 ng/ml. The selected combination of anticoagulant and stabilizer solution allows storage of plasma samples in freezing chamber for 28 days.

Conclusion. The developed method has been fully validated and confirmed its suitability for quantitative determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in the blood plasma of laboratory animals. The method has been successfully used for pharmacokinetic study of 1 % ocular suspension of the drug.

Keywords: HPLC-MS/MS, plasma, stabilization, validation, pharmacokinetics, carbonic anhydrase II inhibitor, N-hydroxysulfonamide

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. Ilya I. Yaichkov carried out the development and validation of bioanalytical methods, analysis of animal samples. Mikhail K. Korsakov, Anton A. Shetnev carried out formulation of aims and objectives, the organizational part of the study. Nikita N. Volkhin, Sergey S. Petukhov carried out the experiment on laboratory animals.

Funding. The article was prepared within the framework of the State assignment of the Yaroslavl State Pedagogical University named after. K. D. Ushinsky for 2024 from the Ministry of Education of Russia on the topic "Development of a new drug for the treatment of neurodegenerative diseases based on a monoamine oxidase inhibitor" (registry entry number 720000Ф.99.1.5Н62АА12000).

For citation: Yaichkov I. I., Korsakov M. K., Shetnev A. A., Volkhin N. N., Petukhov S. S. Development and validation of the method of quantification of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in laboratory animal plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(3):219–230. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1771>

ВВЕДЕНИЕ

Глаукома является одной из главных причин необратимой слепоты. Повышенное внутриглазное давление (IOP – intraocular pressure) – основной симптом и начальное звено патогенеза данного заболевания. Одним из способов снижения IOP при глаукоме является снижение секреции внутриглазной жидкости за счет ингибирования карбоангидразы II цилиарного тела глаза [1, 2]. 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамид (TFISA) (рисунок 1 А) является новым селективным ингибитором карбоангидразы II (iCAII), применяемым в форме 1%-й глазной суспензии. По своей фармакологической активности данное лекарственное средство (ЛС) превосходит ранее разработанные дорзоламид, бринзоламид, а также производные 1,3-оксазола нового поколения [3–5]. TFISA подвергается биотрансформации с образованием двух метаболитов: N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M_1) (рисунок 1 Б) и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M_2) (рисунок 1 В) [6].

Изучение фармакокинетики является обязательной частью доклинического исследования любого ЛС, в том числе и глазных лекарственных форм. Начальным этапом исследования является изучение сис-

темной экспозиции лекарственного вещества и его метаболитов в плазме или сыворотке крови при однократном введении¹. Полученные результаты в дальнейшем служат для определения временных интервалов забора экскретов при изучении элиминации, коррекции временных точек забора органов и тканей при изучении распределения. Биоаналитические методики определения TFISA и его метаболитов M_1 и M_2 в биологических жидкостях ранее не были разработаны. Процесс создания данных методик осложнен высокой реакционной способностью N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M_1). Данное вещество способно разлагаться в биологических пробах с образованием сульфокислоты и оксидов азота [7–9]. Для стабилизации близкого по структуре соединения, N-гидрокси-4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида, применялся 10%-й водный раствор аскорбиновой кислоты. Влияние антикоагулянта на устойчивость этого метаболита в данной работе не изучалось [9].

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с. Доступно по: https://rsmu.ru/fileadmin/templates/DOC/Zakon_RF/Mironov_Rukovodstvo_po_provedeniju_doklinicheskikh_issledovaniy_lekarstvennykh_sredstv.pdf. Ссылка активна на 27.02.2024.

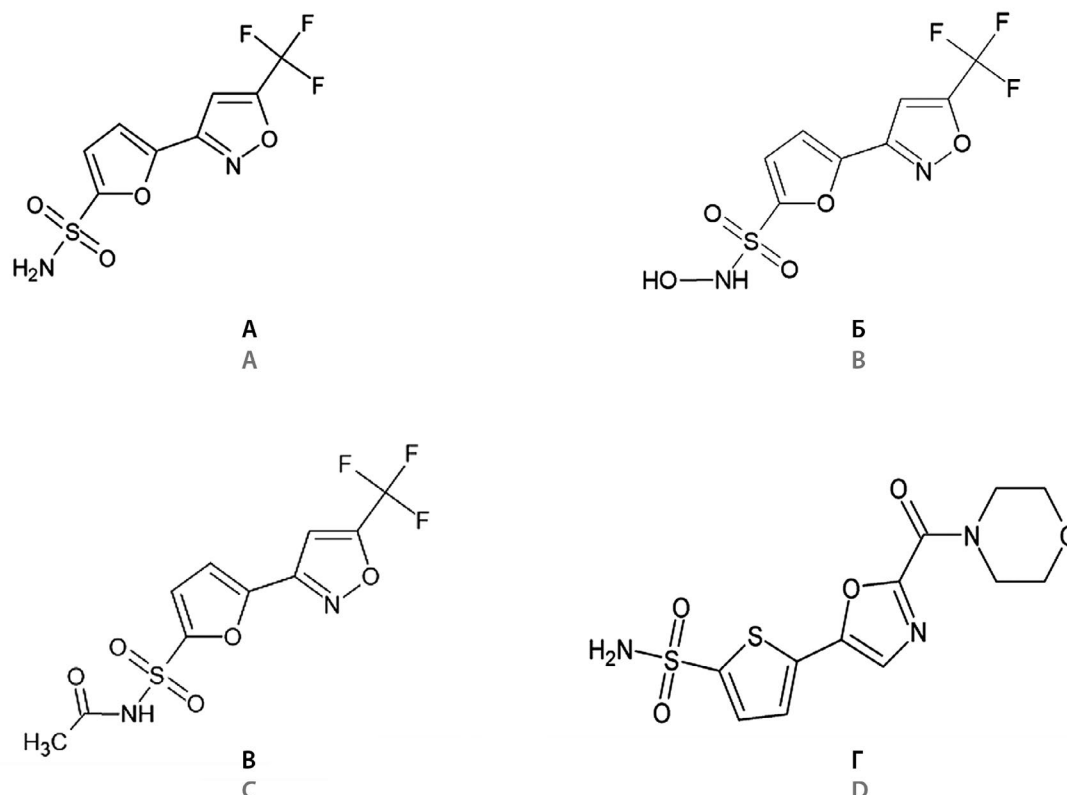


Рисунок 1. Структурные формулы 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (А); N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (Б); N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (В) и 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамида (Г)

Figure 1. The structures of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (A); N-hydroxy-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (B); N-acetyl-5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (C); 5-[2-(morpholine-4-carbonyl)-1,3-oxazole-5-yl]-thiophene-2-sulfonamide (D)

Таким образом, целью исследования является разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме крысы и кролика методом ВЭЖХ-МС/МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Для количественного определения TFISA и его метаболитов в биологических объектах использовалась ВЭЖХ-МС/МС-система, состоящая из tandemного масс-спектрометрического детектора AB SCIEX QTRAP5500 (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур) и хроматографа 1260 Infinity (Agilent Technologies, Германия; бинарный насос G1312B, автосемплер G1329B с термостатом G1330B, термостат колонок G1316A). Управление прибором осуществлялось с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.2, интегрирование полученных хроматограмм – с помощью программного обеспечения MultiQuant 3.0.5.

Реактивы и стандартные образцы

Для приготовления подвижной фазы применяли метанол (LiChrosolv® hypergrade for LC-MS, Merck KGaA, Германия) и муравьиную кислоту (Optima® LC/MS Grade, Thermo Fisher Scientific, США) качества для ВЭЖХ-МС, а также деионизированную воду, полученную с помощью установки arium® mini (Sartorius AG, Германия). При подборе стабилизатора были опробованы 5%-е и 10%-е водные растворы аскорбиновой кислоты («х.ч.», АО «ЛенРеактив», Россия), натрия сульфита («ч.д.а.», АО «ЛенРеактив», Россия), натрия тиосульфата пентагидрата (≥98 %, Scharlau, Китай), натрия пиросульфита («х.ч.», АО «Химреактивснаб», Россия), а также 250 мМ водный раствор ацетата аммония (HPLC-Grade, High Purity Laboratory Chemicals Pvt. Ltd., Индия) с pH 3,8.

В качестве стандартных образцов использовались субстанции 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (99,1 %), N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (98,2 %), N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-ок-

сазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (98,5 %), синтезированных в Центре трансфера фармацевтических технологий им. М. В. Дорогова ЯГПУ им. К. Д. Ушинского. С применением данных образцов готовились отдельные стандартные растворы в диметилсульфоксиде («х.ч.», АО «ЛенРеактив», Россия) в концентрации 1000 мкг/мл. В качестве внутреннего стандарта (BC) был выбран близкий по структуре к анализам 5-[2-(морфолин-4-карбонил)-1,3-оксазол-5-ил]-тиофен-2-сульфонамид (98,4 %) (THSA) (рисунок 1 Г), также произведенный в данной лаборатории.

Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования

Для хроматографического разделения использовалась хроматографическая колонка Zorbax Eclipse Plus C18 (150 × 3,0 мм, 3,5 мкм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 (12,5 × 2,1 мм, 5,0 мкм). Для градиентного элюирования применяли 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде и метанол (таблица 1).

Таблица 1. Условия градиентного элюирования

Table 1. Gradient elution conditions

Время, мин Time, min	Скорость потока, мкл/мин Flow rate, µl/min	A, %	B, %
0,0	600	65	35
0,5	600	65	35
2,0	600	35	65
5,0	600	35	65
5,1	600	10	90
7,0	600	10	90
7,1	600	65	35
10,0	600	65	35

Примечание. А – водный раствор муравьиной кислоты 0,1%-й; В – метанол.

Note. A – 0.1 % aqueous formic acid solution; B – methanol.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме MRM в отрицательной полярности (таблица 2). Из-за сильных различий в площадях хроматографических пиков анализатов для количественного определения TFISA использовался SRM-переход внутреннего стандарта 342 → 78 m/z с более интенсивным сигналом, для количественного определения M₁ и M₂ – SRM-переход 342 → 110 m/z с менее интенсивным сигналом.

Подготовка проб

Осаждение белков использовалось в качестве метода пробоподготовки: к 20 мкл плазмы добавляли 100 мкл метанольного раствора THSA в концентрации 0,5 мкг/мл, перемешивали и центрифугировали

5 мин при 10 000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в микровставки для виал.

Таблица 2. Параметры масс-спектрометрического детектирования

Table 2. Mass spectrometric detection parameters

Аналит Analyte	Тип Type	SRM-переход SRM transition	
		Q1	Q3
TFISA	Количественный Quantitative	281	136
	Контрольный	281	66
M ₁	Количественный Quantitative	297	136
	Контрольный Control	297	66
M ₂	Количественный Quantitative	323	136
	Контрольный Control	323	66
THSA (внутренний стандарт)	BC для TFISA IS for TFISA	342	78
THSA (Internal standard)	BC для M ₁ , M ₂ IS for M ₁ , M ₂	342	110

Примечание. Количественные SRM-переходы использовались для количественных расчетов; контрольные SRM-переходы использовались для подтверждения корректности идентификации.

Note. Quantitative SRM-transitions were used for quantitative calculations; control SRM transitions were used to confirm the correctness of identification.

Для приготовления калибровочных образцов (K1–K8), образцов контроля качества (LQC, MQC, HQC) и образцов для теста разведения (Dil) к 95 мкл плазмы добавляли 5 мкл комбинированного рабочего раствора с концентрацией, в 20 раз превышающей концентрации анализата в данных пробах (таблица 3). Затем в образец вносили раствор стабилизатора

Валидация методики

Валидация разработанной методики проводилась по показателям «селективность», «градуировочная кривая», «правильность и прецизионность», «эффект разведения образца», «эффект матрицы», «перенос из предыдущей пробы», «стабильность» согласно Решению Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 г. № 85¹. Также была дополнительно подтверждена воспроизводимость при повторном введении аналитической серии и стабильность в цельной крови согласно указаниям

¹ Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85. 2016. Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/456026107>. Ссылка активна на 12.12.2023.

руководства ICH M10¹. Значения концентраций калибровочных образцов (K1–K8), образцов контроля качества (LQC, MQC, HQC) и образцов для теста разведения (Dil) приведены в таблице 3.

Таблица 3. Концентрации 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 3. Concentrations of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in calibration and QC samples

Образец Sample	Концентрация, нг/мл Concentration, ng/ml		
	TFISA	M ₁	M ₂
K1 (LLOQ)	10	1	0.1
K2	50	5	0.5
K3	250	25	2.5
K4	500	50	5.0
K5	1000	100	10.0
K6	2000	200	20.0
K7	3000	300	30.0
K8	4000	400	40.0
LQC	30	3	0.3
MQC	1500	150	15.0
HQC	3500	350	35.0
Dil	7000	700	70.0

Дизайн фармакокинетического эксперимента

Исследование фармакокинетики глазной суспензии TFISA с концентрацией 1 % проводилось на 6 крысах породы Wistar массой $216,17 \pm 26,69$ г (среднее значение $\pm$ SD), полученных из питомника ООО «СМК СТЕЗАР». В изучаемую группу вошли 3 самца и 3 самки. Животные были предварительно катетеризованы в правую яремную вену. Введение производилось путем инстилляции глазной суспензии ЛС. Объем введения в каждый глаз определялся из соотношения 40 мкл препарата на среднюю массу крыс $216,17$ г – $0,185$ мкл/г в каждый глаз. Забор образцов крови в количестве 0,2 мл выполнялся до введения (холостая проба) и через 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 144 ч, 216 ч после введения. В качестве антикоагулянта была использована комбинация натрия фторида и калия оксалата. Каждую пробу разделяли на 2 части: 50 мкл цельной крови отбирали и замораживали до температуры

не выше -70 °C для изучения системной экспозиции данных соединений в крови. Оставшуюся часть центрифугировали в течение 10 мин при 2500 об/мин, отделяли плазму, добавляли 5%-й раствор аскорбиновой кислоты и замораживали. При оценке фармакокинетических параметров TFISA, M₁ и M₂ применяли некомпартментный подход. Рассчитывались следующие фармакокинетические константы с помощью пакета R v. 3.3.2, модуль Bear v. 2.7.7: максимальная концентрация ЛС в плазме (C_{max}); время достижения максимальной концентрации ЛС в плазме (T_{max}); площадь под фармакокинетической кривой, начиная с момента приема препарата до времени отбора последнего образца крови (AUC_{0-t}); площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$); константа элиминации (k_e); период полувыведения ЛС ($T_{1/2}$); среднее время удержания ЛС в крови (среднее резидентное время, MRT). Описательная статистика [среднее значение, стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD), стандартная ошибка среднего (SEM)] рассчитывалась с помощью ПО StatSoft STATISTICA 10.0.1011.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе разработки проводили подбор комбинации антикоагулянта и раствора стабилизатора для предотвращения разложения основного метаболита N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида. Растворы антиоксидантов и ацетата аммония (pH = 3,8, 250 мМ) добавлялись к плазме, содержащей K₃-ЭДТА, гепаринат лития или натрия фторид/калия оксалат (NaF/K₂C₂O₄), в объемном соотношении 1:5. На данной стадии исследования оценивались краткосрочная стабильность в плазме (STS) (24 ч при комнатной температуре), стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки (FTS) в плазме, а также стабильность приготовленных проб в автосемплере (ASS) (24 ч при +4 °C) на уровне концентрации HQC. Расчеты проводились методом внешнего стандарта относительно свежеприготовленной пробы. На этапе скрининга анализировалось по 2 образца на изучаемую комбинацию: один образец – из плазмы кролика, второй образец – из плазмы крысы. В объемном соотношении 1:5 не удалось достичь приемлемого результата, поэтому проводился эксперимент с объемным соотношением 1:2 с наиболее перспективными растворами аскорбиновой кислоты (АК) и ацетата аммония (АЦА) (рисунк 2). При применении растворов Na₂SO₃, Na₂S₂O₃, Na₂S₂O₅ в испытаниях STS наблюдалось практически полное разложение аналита. Поэтому на 2 стадии их не использовали. Наилучшие результаты наблюдались при добавлении АК к плазме с гепаринатом лития и NaF/K₂C₂O₄. Для подтверждающего испытания, в ходе которого анализировалось дополнительно 4 образца (2 образца из плазмы кролика и 2 образ-

¹ ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 12.12.2023.

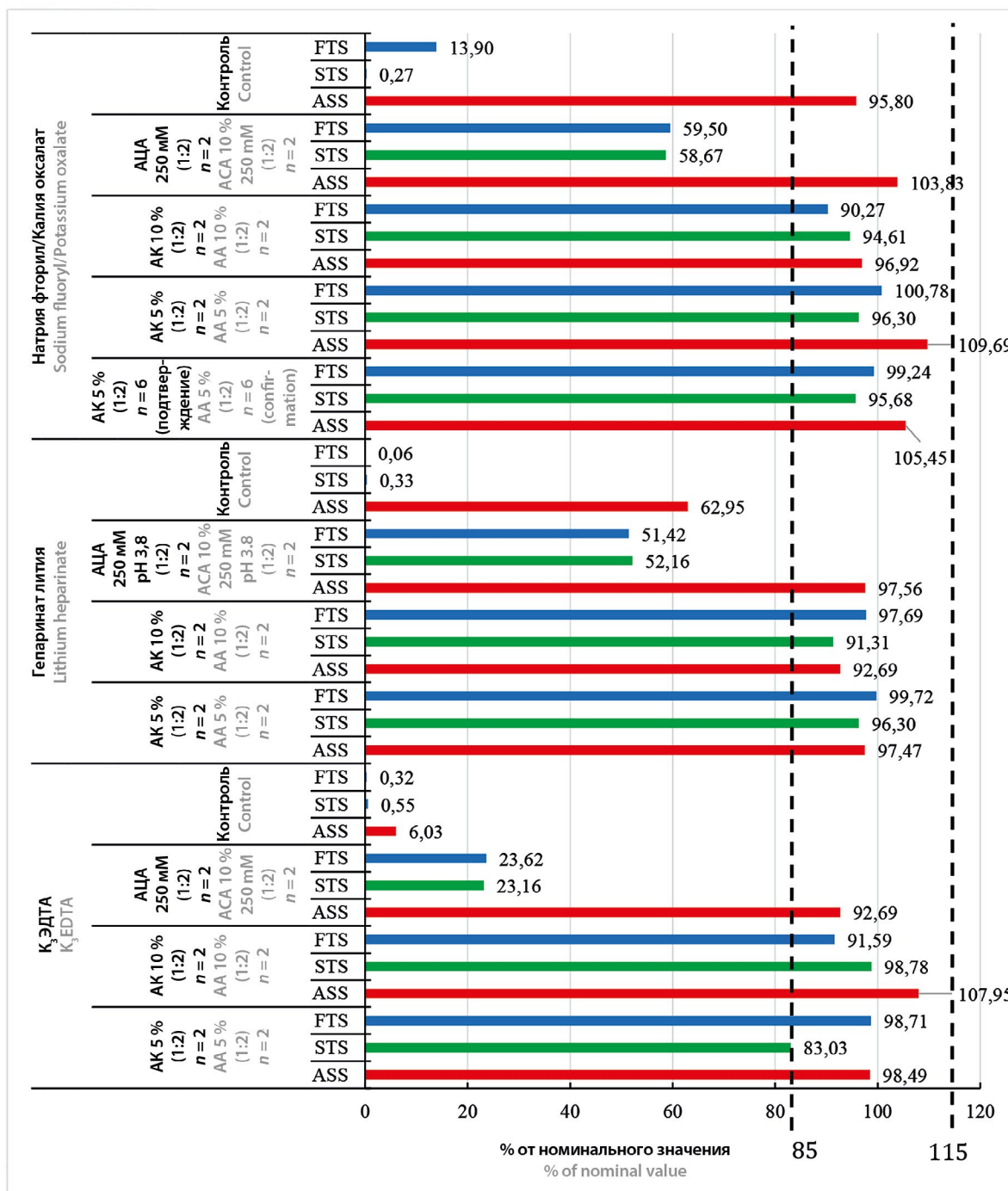


Рисунок 2. Результаты предварительного изучения стабильности M_1

Figure 2. The results of a preliminary stability study of M_1

ца из плазмы крысы), был выбран 5%-й раствор АК в комбинации с $\text{NaF/K}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Результаты укладывались в требуемый диапазон $\pm 15\%$ от номинального значения. Выбор антикоагулянта основан на результатах изучения стабильности M_1 в цельной крови (таблица 4), которые позволили обойтись без применения дополнительных стабилизаторов при хранении ее проб.

На следующем этапе проводилась валидация разработанной методики. Селективность оценивалась отдельно для обоих видов животных совместно с испытанием прецизионности и правильности (таблица 4). На хроматограммах холостого образца площадь хроматографического пика TFISA не превышала 20% от площади хроматографического пика в образце

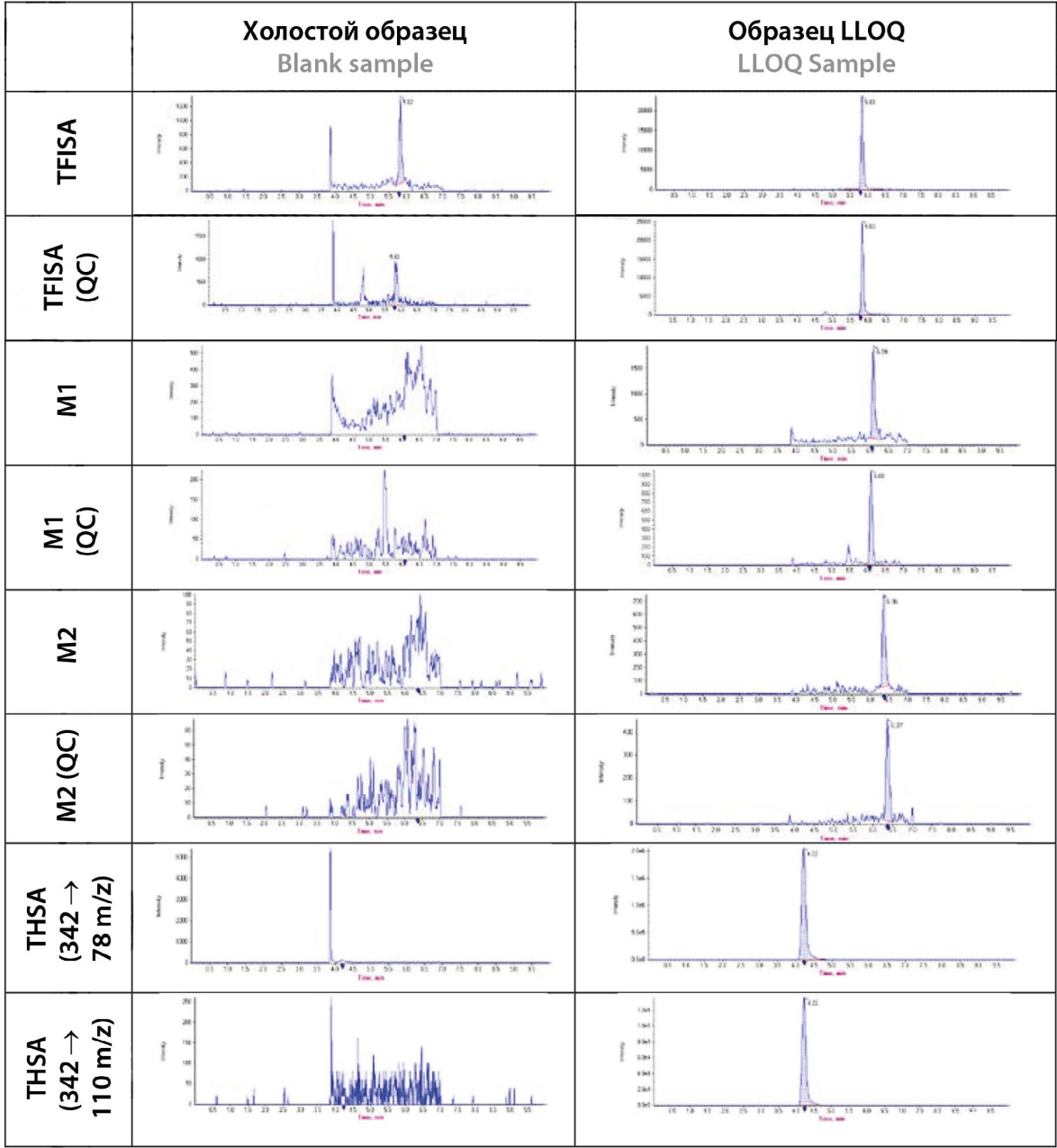


Рисунок 3. Примеры хроматограмм холостого образца стабилизированной плазмы крысы и образца на уровне концентраций LLOQ

Figure 3. Examples of chromatograms of a blank sample of stabilized rat plasma and a LLOQ sample

LLOQ (рисунок 3). Аналитический сигнал других соединений в интактных пробах отсутствовал. Зависимость соотношения площадей пиков «аналит/ВС» от концентрации TFISA, M₁ и M₂ носила линейный характер (рисунок 4). Оценка матричных эффектов проводилась как согласно требованиям нормативного документа ЕАЭС путем расчета коэффициента вариации нормализованного фактора матрицы (NMF) (таблица 5), так и согласно международным требованиям путем оценки правильности и прецизионности рас-

считанных концентраций (таблица 4). Испытание вторым способом проводилось в рамках аналитической серии по оценке правильности и прецизионности. При проведении обоих тестов готовилось по 6 образцов контроля качества на нижнем и на верхнем уровне концентраций (таблица 5) с применением пулов плазмы, полученных от 6 разных животных, включая гемолизированную плазму. Результаты оценки матричных эффектов для каждого аналита соответствовали установленным требованиям.

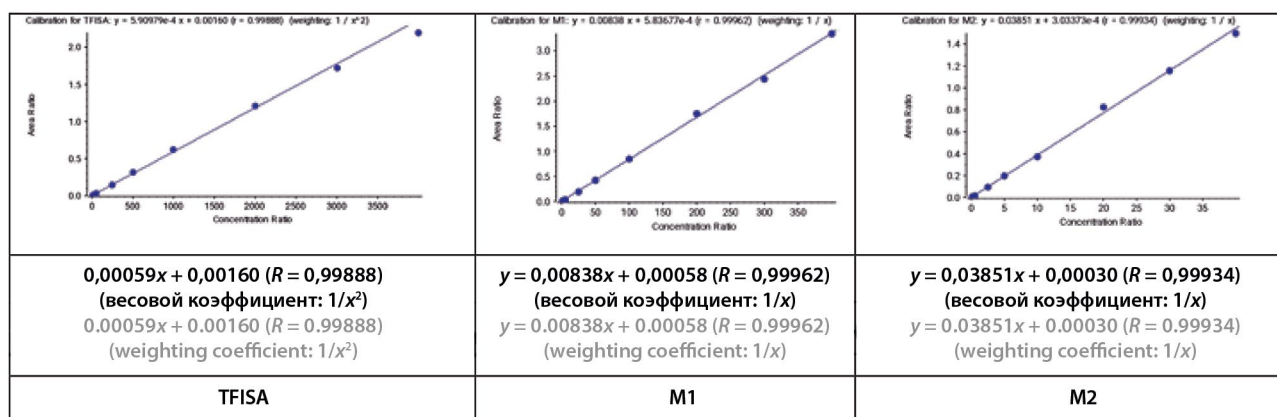


Рисунок 4. Примеры калибровочных кривых изучаемых соединений

Figure 4. Examples of calibration curves of the studied compounds

Таблица 4. Результаты оценки правильности и прецизионности методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме

Table 4. The results of evaluation of accuracy and precision of the method of determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in plasma

Испытание Test		Концентрация Concentration	TFISA		M ₁		M ₂	
			δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %
Внутрисерийная правильность и прецизионность Intraday accuracy and precision	Серия 1 Batch 1	LLOQ	−0,03	3,02	2,67	4,88	−3,33	8,45
		LQC	−1,16	8,71	−4,56	5,93	0,00	9,89
		MQC	2,93	2,63	2,25	4,26	3,07	10,63
		HQC	−9,00	4,53	−7,71	4,77	−13,17	4,13
	Серия 2 Batch 2	LLOQ	−5,30	5,13	12,67	3,71	8,33	6,95
		LQC	9,72	3,18	8,28	3,57	12,22	4,47
		MQC	10,70	3,42	7,93	2,23	11,73	2,48
		HQC	−1,13	3,46	2,27	3,30	6,91	2,43
	Серия 3 Batch 3	LLOQ	1,83	3,76	−7,50	5,50	−3,33	10,68
		LQC	4,45	4,38	−1,89	8,35	2,78	7,23
		MQC	4,87	5,82	2,97	6,91	−0,97	5,46
		HQC	−7,10	4,55	−3,87	3,92	−1,68	5,65
	Серия 4 Batch 4	LLOQ	−15,48	5,72	−2,17	12,41	−3,33	15,58
		LQC	−5,10	8,75	4,56	5,33	10,00	3,32
		MQC	7,03	3,05	7,56	3,02	12,87	2,90
		HQC	−5,73	5,41	0,99	3,40	7,86	2,71
Межсерийная правильность и прецизионность Interday accuracy and precision		LLOQ	−4,75	8,31	1,42	10,08	−0,42	11,27
		LQC	1,98	8,27	1,60	7,53	6,25	7,76
		MQC	6,38	4,59	5,18	4,81	6,68	7,94
		HQC	−5,74	5,26	−2,08	5,49	−0,02	9,35
Воспроизводимость при повторном вводе серии (48 ч) Reinjection reproducibility (48 h)		LLOQ	−8,13	14,73	−1,67	13,10	−1,67	17,52
		LQC	2,79	4,74	4,33	6,46	8,33	11,47
		MQC	0,61	2,17	−1,39	2,53	2,30	2,63
		HQC	−11,82	4,46	−6,53	5,89	−3,01	4,88
Эффект разведения образца Dilution integrity		Dil	−10,37	4,60	−8,07	4,25	−0,32	6,35

Примечание. Серии 1 и 2 выполнены на плазме крысы, серии 3 и 4 выполнены на плазме кролика; в рамках серий 2 и 4 выполнялась изучение селективности методики и эффекта матрицы согласно ICH M10.

Note. Series 1 and 2 were performed on rat plasma, series 3 and 4 were performed on rabbit plasma; selectivity of the method and the matrix effect according to ICH M10 were studied within series 2 and 4.

Таблица 5. Оценка эффекта матрицы методики определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме

Table 5. Evaluation of matrix effect of the method of determination of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in plasma

Объект Subject	Показатель Parameter	TFISA		M ₁		M ₂	
		LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
Плазма крысы Rat plasma	NMF	0,811	0,725	0,753	0,708	0,809	0,774
	RSD (NMF), %	5,77	3,55	5,99	3,38	5,26	3,95
Плазма кролика Rabbit plasma	NMF	0,789	0,727	0,767	0,739	0,839	0,789
	RSD (NMF), %	7,30	4,34	1,87	6,22	2,50	5,88

При изучении правильности и прецизионности методики анализировалось по 2 серии на модельных пробах крыс и кроликов (таблица 4). При этом было приготовлено по 6 образцов каждой концентрации (таблица 5). Величина относительной погрешности (δ) определения TFISA, M₁ и M₂ укладывалась в диапазон $\pm 15\%$ на уровнях LQC, MQC, HQC, величина RSD не превышала 15 %. Для уровня концентраций LLOQ значение δ было в пределах $\pm 20\%$, значение RSD – менее 20 % для каждого аналита. Близкие величины NMF в образцах данных животных (таблица 5) позволили объединить результаты внутрисерийных тестов при оценке межсерийной правильности и прецизионности. Двукратное разведение пробы холостым образцом не влияло на метрологические характеристики методики (таблица 4). Перенос аналитов и внутреннего стандарта из

Выполненные валидационные испытания краткосрочной стабильности, стабильности после 3 циклов заморозки/разморозки, стабильности в приготовленных пробах в автосемплере, долгосрочной стабильности в морозильной камере при температуре не вы-

ше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (LTS) соответствуют установленным требованиям (таблица 6). На каждом уровне концентраций было приготовлено по 6 образцов на плазме крысы. Дополнительные исследования с применением биологических объектов кролика не проводились ввиду приемлемого результата предварительных испытаний (см. рисунок 2), в ходе которых различий в стабильности в плазме обоих видов животных не выявлено. При повторном введении аналитической серии спустя 48 ч правильность и прецизионность измерений сохраняются. Таким образом, использованная комбинация антиоксиданта и антикоагулянта предотвращают разложение M₁ при хранении образцов плазмы.

Методика была апробирована во время изучения фармакокинетики 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида в форме 1%-й глазной суспензии при однократном введении крысам. Полученные значения фармакокинетических параметров TFISA и его метаболитов представлены в таблице 7, их фармакокинетические профили – на рисунке 5.

Таблица 6. Изучение стабильности 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме

Table 6. Stability study of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in plasma

Испытание Test	Температурный режим Temperature mode	% от номинального значения % from nominal value					
		TFISA		M ₁		M ₂	
		LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
STS	Комнатная температура (24 ч) Room temperature (24 h)	-6,32	-8,17	-2,11	-8,10	-0,56	-7,43
FTS	Не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (12 ч) / комнатная температура (4 ч) No higher than $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (12 h) / room temperature (4 h)	-3,85	-9,37	-6,17	-3,29	2,22	-11,80
ASS	Не выше $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (48 ч) No higher than $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (48 h)	-2,56	-13,01	-1,78	-9,99	2,78	-3,68
LTS	Не выше $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (28 дней) No higher than $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (28 days)	7,88	9,82	6,39	12,09	0,49	10,74
Стабильность в цельной крови Stability in whole blood	Комнатная температура (24 ч) Room temperature (24 h)	5,72	-8,78	3,92	-9,57	0,22	4,69

Таблица 7. Фармакокинетические параметры 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в плазме крови крысы

Table 7. The pharmacokinetic parameters of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide and its metabolites in rat plasma

Параметр Parameter		$C_{\max}$, нг/мл $C_{\max}$, ng/ml	$T_{\max}$, ч $T_{\max}$, h	AUC_{0-t} , нг·ч/мл AUC_{0-t} , ng·h/ml	$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл $AUC_{0-\infty}$, ng·h/ml	$T_{1/2}$, ч $T_{1/2}$, h	K_{el} , ч ⁻¹ K_{el} , h ⁻¹	MRT, ч MRT, h
TFISA (n = 6)	Среднее значение Mean	267,93	2,58	7600,67	8828,70	72,08	0,0110	56,42
	SD	109,50	2,06	3916,50	3753,07	30,79	0,0040	10,37
	RSD	40,87	79,72	51,53	42,51	42,72	36,66	18,38
	SEM	44,70	0,84	1598,90	1532,18	12,57	0,0016	4,23
M_1 (n = 6)	Среднее значение Mean	24,45	7,67	374,65	403,09	14,20	0,0537	16,42
	SD	10,53	2,34	82,19	71,40	4,98	0,0175	3,70
	RSD	43,06	30,50	21,94	17,71	35,12	32,63	22,51
	SEM	4,30	0,95	33,56	29,15	2,04	0,0071	1,51
M_2 (n = 6)	Среднее значение Mean	3,04	2,75	33,95	37,53	18,38	0,0415	14,95
	RSD	0,76	1,08	11,30	12,00	5,88	0,0147	2,84
	CV	24,94	39,42	33,28	31,98	32,01	35,30	19,02
	SEM	0,31	0,44	4,61	4,90	2,40	0,0060	1,16

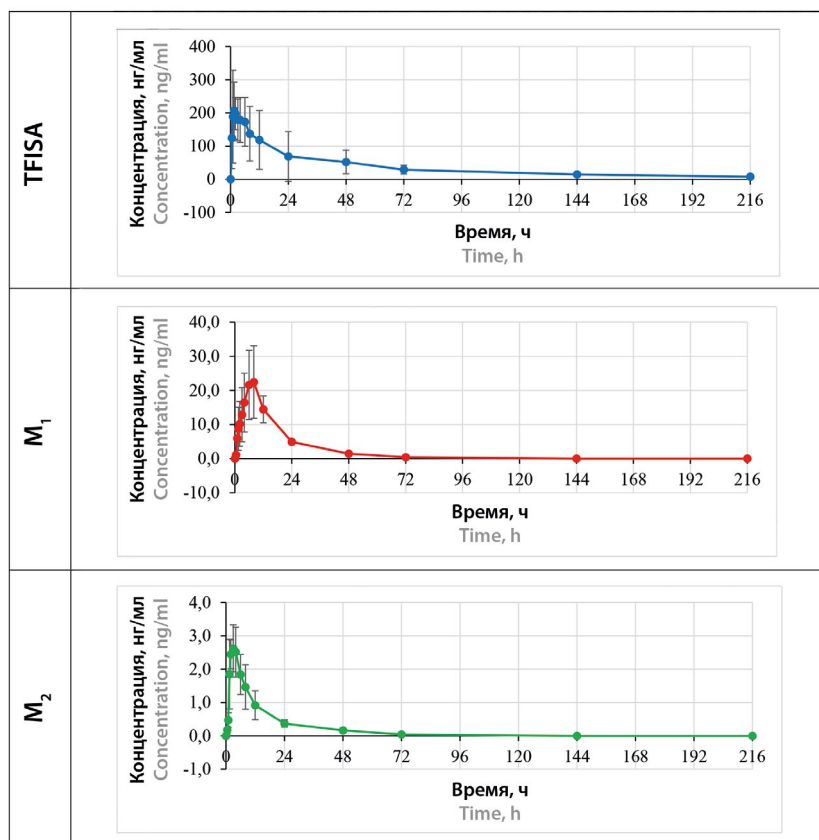


Рисунок 5. Усреднённые фармакокинетические кривые (со стандартными отклонениями) 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в плазме крови крысы

Figure 5. Averaged pharmacokinetic curves (with standard deviations) of 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfanilamide and its metabolites in rat blood plasma

Полученные значения фармакокинетических параметров $C_{\max}$ и AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ TFISA имеют высокие значения коэффициентов вариации. Максимальная концентрация данного соединения достигается в промежутке 0,5–6 ч после введения. Изучаемое ЛС имеет достаточно длительный период полувыведения – 72,08 ч, что может быть связано с его возможным депонированием в эритроцитах (таблица 7). Так, концентрации в крови близкого по структуре iCAII 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамида более чем в 30 раз выше, чем в плазме [9]. Дорзоламид и бринзоламид также накапливаются в эритроцитах [4, 5].

Максимальная концентрация M_1 составляет $24,45 \pm 10,53$ нг/мл (среднее значение $\pm SD$), что значительно выше, чем $C_{\max}$ M_2 . Она достигается через $7,67 \pm 2,34$ ч (среднее значение $\pm SD$) после введения. Это приблизительно на 5,5 ч позже $T_{\max}$ 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида. Концентрация M_2 достигает максимальных значений спустя $2,75 \pm 1,08$ ч после глазной инстилляции ЛС, что близко к величине $T_{\max}$ TFISA. Параметры AUC_{0-t} метаболитов имеют меньшую вариабельность: их величина CV не превышает 34 %. Также M_1 и M_2 имеют более быстрый период полувыведения – 14,20 ч и 18,38 ч соответственно (таблица 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида и его метаболитов в плазме крови крысы и кролика прошла полную валидацию по показателям «селективность», «калибровочная зависимость», «правильность и прецизионность внутри цикла и между циклами», «эффект разведения», «эффект переноса из предыдущей пробы», «эффект матрицы», «воспроизводимость при повторном введении аналитической серии», «стабильность». Применение комбинации натрия фторида и калия оксалата в качестве антикоагулянта, а также добавление к пробам 5 % раствора аскорбиновой кислоты в объемном соотношении 1:2 гарантирует стабильность основного метаболита N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламида в образцах плазмы как минимум в течение 28 дней хранения в морозильной камере. Методика успешно апробирована при изучении фармакокинетики при однократном введении глазной суспензии TFISA крысам. Установлено, что основным метаболитом исследуемого препарата является его N-гидроксипроизводное, а N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфаниламид образуется в значительно меньших количествах. Длительный период полувыведения лекарственного препарата указывает на его воз-

можное депонирование в эритроцитах. В дальнейшем разработанная методика будет использована для анализа проб крыс после внутрибрюшинного введения TFISA с целью оценки абсолютной биодоступности, а также многократной глазной инстилляции. Для выявления межвидовых различий планируется проведение исследования фармакокинетики изучаемого препарата на кроликах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kurysheva N.I. Carbonic Anhydrase Inhibitors in the Treatment of Glaucoma. Review. Part II. *Ophthalmology in Russia*. 2020;17(4):676–682. (In Russ.) DOI: 10.18008/1816-5095-2020-4-676-682.
2. Popovic M.M., Schlenker M.B., Thiruchelvam D., Redelmeier D.A. Serious Adverse Events of Oral and Topical Carbonic Anhydrase Inhibitors. *JAMA Ophthalmology*. 2022; 140(3):235–242. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2021.5977.
3. Khokhlov A.L., Shetnev A.A., Korsakov M.K., Fedorov V.N., Tyushina A.N., Volkhin N.N., Vdovichenko V.P. Pharmacological properties of sulfonamide derivatives – new inhibitors of carbonic anhydrase. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;175(2):166–170. (In Russ.) DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-2-166-170.
4. Lo Faro A.F., Tini A., Gottardi M., Pirani F., Sirignano A., Giorgetti R., Busard F.P. Development and validation of a fast ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determining carbonic anhydrase inhibitors and their metabolites in urine and hair. *Drug Testing and Analysis*. 2021;13(8):1552–1560. DOI: 10.1002/dta.3055.
5. Madrewar A.B., Deshpande A., Bhattacharya S. Mini-Review on Bioanalytical Estimation of Brinzolamide. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2022;18(3):265–272. DOI: 10.2174/1573412917666210812103414.
6. Khokhlov A.L., Yaichkov I.I., Shetnev A.A., Ivanovsky S.A., Korsakov M.K., Alexeev M.A., Gasilina O.A., Volkhin N.N., Petukhov S.S. Identification and synthesis of metabolites of the new antiglaucoma drug. *Research Results in Pharmacology*. 2024;10(1):53–66. DOI: 10.18413/rpharmacology.10.431.
7. Raghuvanshi D.S., Verma N. An iodine-mediated new avenue to sulfonylation employing N-hydroxy aryl sulfonamide as a sulfonylating agent. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2021;19:4760–4767. DOI: 10.1039/d1ob00036e.
8. Wang F.-X., Zhou S.-D., Wang C., Tian S.-K. N-Hydroxy sulfonamides as new sulfonylating agents for the functionalization of aromatic compounds. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2017;15(25):5284–5288. DOI: 10.1039/c7ob01390f.
9. Khokhlov A.L., Yaichkov I.I., Korsakov M.K., Shetnev A.A., Volkhin N.N., Petukhov S.S. Development of quantification methods of a new selective carbonic anhydrase II inhibitor in plasma and blood and study of the pharmacokinetics of its ophthalmic suspension in rats. *Research Results in Pharmacology*. 2023;9(4):53–64. DOI: 10.18413/rpharmacology.9.10056.

pharmtech & ingredients

26-Я МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА ОБОРУДОВАНИЯ,
СЫРЬЯ И ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО
ПРОИЗВОДСТВА



19–22.11.2024

МОСКВА,
КРОКУС ЭКСПО

ПОЛУЧИТЕ
БЕСПЛАТНЫЙ БИЛЕТ
НА САЙТЕ ПО ПРОМО-КОДУ:
print24

PHARMTECH-EXPO.RU

+7 495 799 55 85
pharmtech@ite.group



ОРГАНИЗАТОР
ORGANISER



ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Разработка и регистрация лекарственных средств» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», должно соответствовать науке:

- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки);
- 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 3.4.2. 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 A4 Microsoft Word (*.doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

Перечень документов, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

2. РУКОПИСЬ

РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией
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: Синдронол 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-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацевтикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-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, написание рукописи и т. д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по ал-

фавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте <http://www.translit.ru>

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.

5. В конце описания в круглых скобках указывается (In Russ.).

Образец оформления списка литературы

Литература/References

1. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychopharmacogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117 DOI: 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 предоставляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подписью на русском и английском языках. В подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуточные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник, представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подписей рисунков на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате *.tif, *.jpg, *.cdr, *.ai, с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.



*№ 18906 в реестре Российского ПО

ФАРМРЕГИСТРАЦИЯ

Незаменимо удобный помощник
в подготовке электронного
XML досье соответствующего
стандарта для загрузки на
сайт Минздрава

фармрегистрация.рф



Продолжайте работу с досье без прерываний

Вы можете легко импортировать и
продолжать вести досье из других
систем. Переносите данные без потерь
и сосредоточьтесь на разработке новых
препаратов



Удобство и эффективность

Поддержка различных вариантов экспорта и импорта
в XML-файлы позволяет гибко работать с данными.
Автоматическая проверка досье перед загрузкой в
Минздрав обеспечивает точность и соответствие
требованиям. Для работы с программой не требуется
ИС, а также подключение к интернету, что делает её
доступной и автономной

Лучшая цена
на рынке!



Журнал является *Open Access* изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.

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.

Основные пять тематических разделов журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», соответствует отраслям науки:

- ✓ 3.2.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки).
- ✓ 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки).
- ✓ 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Журнал индексируется в ведущих научных базах:

- ✓ Scopus (Q3).
- ✓ Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
- ✓ Высшая аттестационная комиссия (ВАК).
- ✓ А также ВИНТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Издательские услуги:

Английский перевод статей

- Услуга комплексного перевода.
- Производство англоязычной статьи, включающее верстку и научный перевод.

Специальный выпуск журнала

- При заключении договора сотрудничества возможна публикации специального выпуска журнала.
Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России», был выпущен номером Том 10, № 4 (2021).

Журнал является **Open Access** изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.



Основатель журнала и главный редактор – д. фарм. н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохин Игорь Евгеньевич**

По вопросам сотрудничества просьба обращаться на почту: **info@cpha.ru**



Электронный журнал

Печатный журнал

Информационный ресурс

Фармацевтический журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Это научный журнал международного уровня и интернет-ресурс для специалистов, задействованных в сфере обращения лекарственных средств.

Наша аудитория:

Среди наших читателей специалисты и руководители отделов разработки ЛС, контроля и обеспечения качества, специалисты по ДКИ, КИ, отделов регистрации, сотрудники аналитических лабораторий, технологи, инженеры, а также топ-менеджмент фармацевтических компаний.

Разделы журнала:

- ✓ Поиск и разработка новых лекарственных средств.
- ✓ Фармацевтическая технология.
- ✓ Методы анализа лекарственных средств.
- ✓ Доклинические и клинические исследования.
- ✓ Регуляторные вопросы.

Журнал индексируется в ведущих научных базах:

- ✓ Scopus (Q3).
- ✓ Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
- ✓ Высшая аттестационная комиссия (ВАК).
- ✓ А также ВИНИТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Периодичность выхода номеров журнала 4 раза в год

Мы в Telegram



По вопросам сотрудничества
info@pharmjournal.ru
info@chpa.ru