WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN2305-2066

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

pharmtech & ingredients

АНАЛИТИКА ЭКСПО

IPhEB & CPhI russia

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

GXP

В НОМЕРЕ:

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ИННОВАЦИОННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДАРУНОВИРА ЭТАНОЛАТА

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛХС-1208 В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАРКОТИКОВ

ИЗУЧЕНИЕ СРАВНИТЕЛЬНОЙ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ ЛП ВАЛСАРТАН II КЛАССА БКС В СООТВЕТСТВИИ С ПРОЦЕДУРОЙ «БИОВЕЙВЕР»

ОПЫТ СЕРТИФИКАЦИИ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ПО ГОСТ 33044-2014 «ПРИНЦИПЫ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРКАТИКИ»

№ 4 (17) НОЯБРЬ 2016

Summum bonum medicinae sanitas

СОЗДАНИЕ И МОДЕРНИЗАЦИЯ ПРЕДПРИЯТИЙ «ПОД КЛЮЧ» ОТ ИДЕИ ДО ВЫПУСКА ПЕРВОЙ СЕРИИ ПРЕПАРАТА

ПРОЕКТИРОВАНИЕ

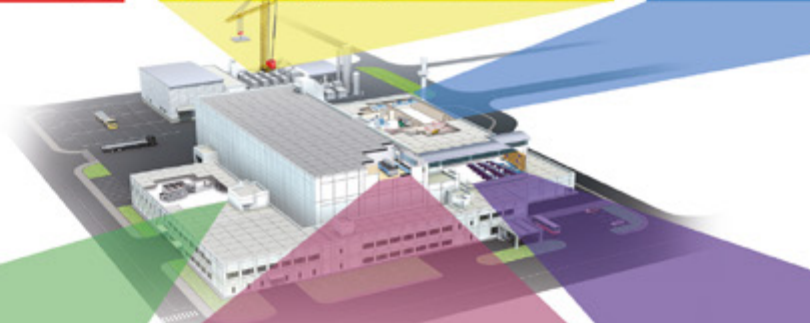
- Концептуальное проектирование
- Проектирование на стадии Проект (П) и Рабочая документация (Р)
- Прохождение экспертизы
- Проведение квалификации DQ
- Автоматизированное проектирование
- Авторский надзор
- Управление проектами

СТРОИТЕЛЬСТВО

- Модульные здания из легковозводимых конструкций
- Реконструкция объектов
- Прокладка инженерных сетей
- Электромонтажные работы
- Внутренние отделочные работы
- Фасадные работы

ИНЖИНИРИНГ И КОМПЛЕКС ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

- Проектирование чистых помещений
- Производство ограждающих конструкций
- Проектирование и монтаж инженерных систем
- Проектирование систем водоподготовки
- IQ/OQ/PQ квалификация и валидация



ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ

- Подготовка и согласование технического задания, формирование технико-коммерческих предложений
- Разработка детальных спецификаций оборудования и сопровождающей документации
- Подбор и поставка оборудования для биотехнологических производств, синтеза субстанций, ГЛФ и упаковки
- Сопровождение поставки, включая SAT и FAT
- Сопровождение валидационных работ IQ/OQ

ЛАБОРАТОРНОЕ ОСНАЩЕНИЕ

- Лаборатории доклинических исследований
- Оснащение клинических лабораторий
- Исследовательские лаборатории
- Испытательные лаборатории
- Микробиологические лаборатории
- Контроль качества радифармпрепаратов
- Масштабирование процессов: от лабораторного до промышленного

СЕРВИС, ВАЛИДАЦИЯ, ОБУЧЕНИЕ

- Сервисное обслуживание
- Квалификация оборудования
- Калибровка
- Валидация
- Инсталляция Ввод в эксплуатацию
- Постановка методики
- Клиентский сервис

Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252–00–98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)

8 800 333–69–11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)

www.phct–group.com
info@phct–group.com

WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Учредитель
Группа компаний «Фармконтракт»
ГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Директор журнала
Дорина Е.А., к.п.н.

Редакционная коллегия
Главный редактор:
Шохин И.Е., к.фарм.н.
info@pharmjournal.ru

Редактор раздела «Фармацевтическая технология и нанотехнологии»:
Демина Н.Б., проф., д.фарм.н.

Редактор раздела «Биотехнология»:
Гусаров Д.А., к.х.н.

Редактор раздела «Аналитические методики и методы контроля»:
Медведев Ю.В., к.фарм.н.

Редактор раздела «Эффективность и безопасность лекарственных средств»:
Малашенко Е.А., к.фарм.н.

Редактор раздела «Регуляторные вопросы»:
Василенко И.А., проф., д.х.н.

Русинов В.Л., чл.-корр. РАН, д.х.н.
Белоусов М.В., проф., д.фарм.м.
Емшанова С.В., д.фарм.н.
Князев А.С., доц., д.х.н.
Макеев О.Г., проф., д.м.н.
Попов В.В., проф., д.м.н.
Сливкин А.И., проф., д.фарм.н.
Станишевский Я.М., проф., д.х.н.
Смехова И.Е., д.фарм.н.
Сысуев Б.Б., доц., д.фарм.н.
Чучалин В.С., д.фарм.н.
Аммур Ю.И., к.биол.н.

Кулинич Ю.И., к.фарм.н.
Мустафин Р.И., к.фарм.н.
Павлов В.М., к.фарм.н.
Павлова Л.А., к.фарм.н.
Палеева М.А., к.фарм.н.
Смирнов В.В., к.фарм.н.
Ташлицкий В.Н., к.х.н.
Хуторянский В., проф. (Великобритания)
Боян Салия (Сербия)
Книттер Х.-Ю. (Германия)
Поль Смит (Великобритания)

Секретарь:
Марков П.А.
info@pharmjournal.ru

Дизайн-концепция:
Григорьев В.А.
Михайлова Н.С.
info@phct-media.ru

Редактор-корректор:
Троицкая Е.Н.

Founder
«Pharmcontract» Group of Companies
I.M. Sechenov First Moscow State Medical Universisy
Siberian State Medical University

Journal director
Dorina E.A., PhD

Editorial board
Editor-in-chief:
Shohin I.E., PhD
info@pharmjournal.ru

Editor of «Pharmaceutical Technology and Nanotechnology» part:
Diomina N.B., prof., PhD

Editor of «Biotechnology» part:
Gusarov D.A., PhD

Editor of «Analytical and Quality Control Methods» part:
Medvedev Y.V., PhD

Editor of «Drug Products Efficacy and Safety» part:
Malashenko E.A., PhD

Editor of «Regulatory Issues» part:
Vasilenko I.A., prof., PhD

Rusinov V.L., RAS c.-m., PhD
Belousov M.V., prof., PhD
Emshanova S.V., PhD
Knyazev A.S., as.prof., PhD
Makeev O.G., prof., PhD
Popov V.V., prof., PhD
Slivkin A.I., prof., PhD
Stanishevskiy Ya.M., prof., PhD
Smekhova I.E., PhD
Sysuev B.B., as.prof., PhD
Chuchalin V.S., PhD
Ammur Yu.I., PhD

Kulinich J.I., PhD
Moustafine R.I., PhD
Pavlov V.M., PhD
Pavlova L.A., PhD
Paleeva M.A., PhD
Smirnov V.V., PhD
Tashlitskiy V.N., PhD
Khutoryanskiy V., prof., PhD (UK)
Bojan Calija, as.prof., PhD (Serbia)
Knitter H.-J. (Germany)
Paul Smith (UK)

Secretary:
Markov P.A.
info@pharmjournal.ru

Design concept:
Grigoriev V.A.
Mikhaylova N.S.
info@phct-media.ru

Corrector:
Troitskaya E.N.

Адрес редакции
115054, Россия, Москва,
ул. Дубининская, д. 57/2, оф. 2.306
+7 (495) 720 42 20
info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Отпечатано в типографии
ООО «Юнион Принт»
Россия, 603022, Н. Новгород,
ул. Окский съезд, 2

Ответственность за опубликованные материалы несут авторы

Свидетельство о регистрации СМИ:
ПИ №ФС77-60744 от 11 февраля 2015 г. выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

ISSN 2305-2066

Журнал зарегистрирован в Российском индексе научного цитирования (РИНЦ)
Тираж 40000 экземпляров
Журнал выходит один раз в квартал
Подписной индекс в каталоге «Пресса России» 57964
Цена свободная

Media registration certificate:
ПИ №ФС77-60744, February 11, 2015, given by Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications (ROSKOMNADZOR)

ISSN 2305-2066

Journal is registered in Russian index of scientific citation
Circulation: 40000 copies
A peer-reviewed quarterly journal
Index listing
«The Russian Press» 57964
Free Price

Editorial office address
office 2.306, 57/2, Dubininskaya str.,
Moscow, 115054, Russia
+7 (495) 720 42 20
info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Printing office
Union Print LLC
2, Okskiy s`ezd,
603022, N. Novgorod, Russia

При поддержке ФБУ «ГИЛС и НП»

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

Научно-производственный рецензируемый журнал
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Содержание

Contents

От редакции 6 **Introduction**

События 20 **Occasions**

Мероприятия 24 **Events**

Раздел «Фармацевтическая технология и нанотехнологии»

«Pharmaceutical Technology and Nanotechnology» part

Секция «Современные технологии создания лекарственных форм»

«Modern Technology of Creating Dosage Forms» section

Золотов С.А. Демина Н.Б. Василенко Г.Ф., Демин М.С. 56 *Zolotov S.A., Diomina N.B., Vasilenko G.F., Demin M.S.*

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ИННОВАЦИОННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДАРУНАВИРА ЭТАНОЛАТА

PERSPECTIVE OF INNOVATION DRUG FORMULATION WITH DARUNAVIR ETHANOLAT

Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Дмитриева М.В., Орлова О.Л., Полозкова А.П., Оборотова Н.А., Игнатьева Е.В., Дмитричева Н.А., Ярцева И.В., Шпрах З.С. 62 *Gulyakin I.D., Nikolaeva L.L., Dmitrieva M.V., Orlova O.L., Polozkova A.P., Oborotova N.A., Ignatieva E.V., Dmitricheva N.A., Yartseva I.V., Shprakh Z.S.*

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЛХС-1208 МЕТОДАМИ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

PREPARATION AND ANALYSIS OF LYOPHILIZED DOSAGE FORM LHS-1208 BY THIN CHROMATOGRAPHY AND A SPECTROPHOTOMETERY

Секция «Иммунобиологические препараты»

«Immunobiological drugs» section

Морозова В.С., Мягкова М.А., Суслов В.В., Кедик С.А. 68 *Morozova V.S. , Myagkova M.A., Suslov V.V., Kedik S.A.*

ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАРКОТИКОВ

VACCINE FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF DRUG ADDICTION

Секция «Нанотехнологии»

«Nanotechnology» section

Мизина П.Г., Левачев С.М., Масесе П.М., Панов А.В., Харлов А.Е., Сугак Н.В., Шаталов Д.О. 76 *Mizina P.G., Levachev S.M., Masese P.M., Panov A.V., Harlov A.E., Sugak N.V., Shatalov D.O.*

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИДКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПРИ РАЗРАБОТКЕ СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ СПРЕЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЛОСТИ РТА

OPTIMIZATION OF THE RHEOLOGICAL PARAMETERS OF PILOT LIQUID DOSAGE FORMS IN THE DEVELOPMENT OF SPRAY PREPARATION AND TECHNOLOGY FOR ORAL CAVITY DISEASES TREATMENT

Секция «Лекарственные средства из природного сырья»

«Drug from Natural Raw Materials» section

Соловьёва Н.Л., Сокуренко М.С. 82 *Solovieva N.L., Sokurenko M.S.*

ТЕХНОЛОГИИ ПОВЫШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ (ОБЗОР)

TECHNOLOGIES TO IMPROVE THE STABILITY OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN DRUG DISCOVERY (REVIEW)

Секция «Биофармация»

«Biopharmacy» section

Дёмина Н.Б., Анурова М.Н. 92 *Diomina N.B., Anurova M.N.*

СУППОЗИТОРИИ: АСПЕКТЫ МОДЕРНИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

SUPPOSITORIES: ASPECTS OF DOSAGE FORM MODERNIZATION

Секция «Технологический контроль лекарственных форм»

Анурова М.Н., Бахрушина Е.О., Кречетов С.П. **98**

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА КОМБИНИРОВАННОЙ МАТРИЦЫ НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ПЕРОРАЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ НИМЕСУЛИДА

«In-process Quality Control» section

Anurova M.N., Bakhrushina E.O., Krechetov S.P.

STUDY OF THE MATRIX STRUCTURE INFLUENCE ON THE RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF NIMESULIDE ORAL GEL EXPERIMENTAL SAMPLES

Раздел «Аналитические методики и методы контроля»

«Analytical and Quality Control Methods» part

Секция «Контроль качества химико-фармацевтических препаратов»

«Quality Control of Chemical Drug Products» section

Скосырева Н.С., Малахова Н.А., Сараева С.Ю., Мельникова О.А., Петров А.Ю. **106**

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕРЕБРА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ «АРГАМИД»

Skosyreva N.S., Malakhova N.A., Saraeva S.Y., Melnikova O.A., Petrov A.Y.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR POTENTIOMETRIC DETERMINATION OF SILVER IN PHARMACEUTICAL SUBSTANCE «ARGAMID»

Харитонов Ю.Я., Черкасова О.Г., Завадский С.П., Шабалкина Е.Ю., Краснюк (мл.) И.И., Григорьева В.Ю., Цыбусов С.Н., Абизов Е.А. **112**

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ И МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА МАГНИТНЫХ ЛЕЧЕБНЫХ СРЕДСТВ (МАГНИТНЫХ МАЗЕЙ, МАГНИТНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ, ЖЕЛЕЗОУГЛЕРОДНОГО КОМПОНЕНТА ДЛЯ КРИОХИРУРГИИ)

Kharitonov Yu.Ya., Cherkasova O.G., Zavadskiy S.P., Shabalkina E.Yu., Krasnyuk (jr.) I.I., Grigorjeva V.Yu., Tsybusov S.N., Abizov E.A.

DEVELOPMENT OF THE PROCEDURES OF QUALITY CONTROL OF MAGNETIC MEDICATIONS (MAGNETIC MEDICAL OINTMENTS, MAGNETIC SUPPOSITORIES, IRON-CARBON COMPOSITE FOR THE CRYOSURGERY)

Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Игнатьева Е.В., Дмитричева Н.А., Ярцева И.В., Шпрах З.С. **118**

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛХС-1208 В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

Gulyakin I.D., Nikolaeva L.L., Dmitrieva M.V., Oborotova N.A., Ignatieva E.V., Dmitricheva N.A., Yartseva I.V., Shprakh Z.S.

VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION LHS-1208 IN THE LYOPHILIZED DOSAGE FORM

Бутина Е.В., Зайцев С.А., Басевич А.В. **124**

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В ИННОВАЦИОННОЙ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ МЕТОДОМ ГЖХ ПИД

Butina E.V., Zaitsev S.A., Basevich A.V.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF RESIDUAL ORGANIC SOLVENTS IN INNOVATIVE ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT WITH GC-FID

Стойнова А.М., Пономарева А.В., Станишевский Я.М. **130**

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ

Stoinova A.M., Ponomareova A.V., Stanishevskiy Ya.M.

ASSAY OF ACETYLSALICYLIC ACID IN DRUG PRODUCTS BY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

Секция «Контроль качества лекарственного растительного сырья»

Винокурова О.А., Тринеева О.В., Сливкин А.И. **134**

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ТИМЬЯНА: СОСТАВ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ (ОБЗОР)

Раздел «Эффективность и безопасность лекарственных средств»

Секция «Кинетика растворения»

Бригас Е.Р., Успенская Е.В., Писарев В.В. **152**

ИЗУЧЕНИЕ СРАВНИТЕЛЬНОЙ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ВАЛСАРТАН II КЛАССА БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ В СООТВЕТСТВИИ С ПРОЦЕДУРОЙ «БИОВЕЙВЕР»

Гребёнкин Д.Ю., Станишевский Я.М., Шохин И.Е., Малашенко Е.А. **158**

РЕТРОСПЕКТИВА РАЗВИТИЯ НАУКИ О РАСТВОРЕНИИ ТВЁРДЫХ ДОЗИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ (ОБЗОР)

Пономарева А.В., Дудкин А.В. **168**

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РАЗЛОЖЕНИЯ ВЕЩЕСТВ В ВИДЕ ПОРОШКОВОЙ СМЕСИ С ИНЕРТНЫМ ВЫСОКОТЕПЛОПРОВОДЯЩИМ МАТЕРИАЛОМ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ НА ПРИМЕРЕ ЛЕВОМИЦЕТИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

Секция «Доклинические исследования»

Власов С.С., Кривощеков С.В., Заманова М.К., Белоусов М.В., Гурьев А.М. , Юсубов М.С. **174**

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Мещерякова Н.В., Дашинимаев Э.Б., Марахова А.И. **180**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПРОТАРГОЛА НА ФИБРОБЛАСТЫ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА

Секция «Клинические исследования»

Родина Т.А., Мельников Е.С., Белков С.А., Соколов А.В., Прокофьев А.Б., Сивков А.С. **184**

ЭКСПРЕСС-МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНАЛАПРИЛА И ЕГО ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА ЭНАЛАПРИЛАТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

«Quality Control of Herbal Drug Products» section

Vinokurova O.A., Trineeva O.V., Slivkin A.I. **134**

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF DIFFERENT TYPES OF THYME: THE COMPOSITION, PROPERTIES AND APPLICATION (REVIEW)

«Drug Products Efficacy and Safety» part

«Dissolution Profile Test» section

Brigas E.R., Uspenskaya E.V., Pisarev V.V. **152**

DISSOLUTION PROFILE STUDIES OF BCS CLASS II DRUG VALSARTAN BY BIOWAIVER PROCEDURE

Grebenki D.Yu., Stanishevskii Ya.M., Shohin I.E., Malashenko E.A. **158**

RETROSPECTIVE OF DISSOLUTION TEST OF SOLID DOSAGE FORMS (REVIEW)

Ponomareva A.V., Dudkin A.V. **168**

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINING THE THERMODYNAMIC AND KINETIC PARAMETERS OF DECOMPOSITION SUBSTANCES IN THE FORM OF THE POWDER MIXTURE WITH HIGHLY THERMALLY CONDUCTIVE INERT MATERIAL BY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY ON THE EXAMPLE OF PARACETAMOL AND CHLORAMPHENICOL

«Preclinical Trials» section

Vlasov S.S., Krivoshchekov S.V., Zamanova M.K., Belousov M.V., Guriev A.M., Yusubov M.S. **174**

METHOD VALIDATION FOR DETERMINATION OF THE SULFUR HEXAFLUORIDE IN PLASMA SAMPLES OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Mescheryakova N.V., Dashinimaev E.B., Marakhova A.I. **180**

DEFINITION OF CYTOSTATIC EFFECT OF PROTARGOLUM SOLUTIONS IN DIFFERENT CONCENTRATIONS ON HUMAN DERMAL FIBROBLASTS

«Clinical Trials» section

Rodina T.A., Melnikov E.S., Belkov S.A., Sokolov A.V., Prokofiev A.B., Sivkov A.S. **184**

EXPRESS METHOD FOR DETERMINATION OF ENALAPRIL AND ENALAPRILAT IN HUMAN SERUM BY HPLC-MS/MS

Секция «Биоаналитические методики» ***«Bioanalytical Methods» section***

Маргаева Б.Ю., Шохин И.Е. **190** *Margaeva B.Yu., Shohin I.E.*

РАЗРАБОТКА, ВАЛИДАЦИЯ И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИ-Xa- И АНТИ-IIa-АКТИВНОСТИ ЭНОКСАПАРИНА НАТРИЯ

DEVELOPMENT, VALIDATION AND APPLICATION OF ANTI-Xa- AND ANTI-IIa-ENOXAPARINE SODIUM ASSAY

Егоренков Е.А., Смирнов В.В. **198** *Egorenkov E.A., Smirnov V.V.*

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СОВМЕСТНОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТРАТОВ-МАРКЁРОВ ОСНОВНЫХ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P450 И ИХ МЕТАБОЛИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ-МС/МС

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SIMULTANEOUS ASSAY OF SUBSTRATES-MARKERS OF MAIN CYTOCHROME P450 ISOFORMS AND THEIR METABOLITES USING HPLC-MS/MS

Карлина М.В., Фаустова Н.М., Пожарицкая О.Н., Косман В.М., Макаров В.Г., Шиков А.Н. **204** *Karlina M.V., Faustova N.M., Pozharitskaya O.N., Kosman V.M., Makarov V.G., Shikov A.N.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДАРБЭПОЭТИНА АЛЬФА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРОЛИКОВ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

DETERMINATION OF DARBEPOETIN ALFA IN RABBIT PLASMA BY ELISA

Бойко А.С., Лосенков И.С., Дмитриева Е.Г. **212** *Boiko A.S., Losenkov I.S., Dmitrieva E.G.*

ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ, ДЛИТЕЛЬНО ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИПСИХОТИЧЕСКУЮ ТЕРАПИЮ

MULTIPLEX ANALYSIS OF PERIPHERAL BIOMARKERS IN SCHIZOPHRENIC PATIENTS WITH LONG-TERM ANTIPSYCHOTIC THERAPY

Раздел «Регуляторные вопросы» ***«Regulatory Issues» part***

Крылатова А.А., Шохин И.Е., Образцова Е.П., Монаенков А.О. **218** *Krylatova A.A., Shohin I.E., Obrazcova E.P., Monaenkov A.O.*

ОПЫТ СЕРТИФИКАЦИИ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ СОГЛАСНО ГОСТ 33044-2014 «ПРИНЦИПЫ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ»

EXPERIENCE OF CERTIFICATION BIOANALYTICAL LABORATORY ACCORDING TO REQUIREMENTS OF GOST 33044-2014 «PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE» (GLP)

Яценко К.А., Березина В.С.. **222** *Yatsenko K.A., Berezina V.S.*

РЕГУЛЯТОРНАЯ СТРАТЕГИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ КОМБИНИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

REGULATORY STRATEGY OF CLINICAL DEVELOPMENT FOR FIXED COMBINATION MEDICINAL PRODUCTS

Раздел «История фармации» ***«History of Pharmacy» part***

Зеликсон Ю.И. **230** *Zelikson Yu.I.*

АПТЕЧНОЕ ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВО В РОССИИ XVIII–XIX ВЕКОВ: ПЕРВЫЕ РУССКИЕ ФАРМАКОПЕИ, АПТЕКАРСКИЕ УСТАВЫ

PHARMACEUTICAL LEGISLATION IN RUSSIA IN XVIII–XIX CENTURIES: THE FIRST RUSSIAN PHARMACOPOEIA, APOTHECARY STATUTES

Публикации партнеров **236** ***Partner Publications***

Мнение специалиста **300** ***Spesialist's Opinion***

ОТ РЕДАКЦИИ

XXI век для фармацевтической отрасли все больше становится веком биотехнологий. По прогнозам экспертов и исследователей биологические лекарственные средства имеют высокий потенциал в разы улучшить качество жизни людей за счет разработки новых схем лечения на основе применения лекарственных средств биологического происхождения. Существенный интерес к биофармацевтическим лекарственным средствам обусловлен и тем фактором, что биотехнологии постепенно вытесняют традиционные технологии производства сверхсложных препаратов, сокращая временной интервал от этапа R&D до вывода продукта на рынок. Более того, они открывают принципиально новые возможности не только в производстве современных препаратов медицинского назначения, но и для профилактики заболеваний, разработки новых схем лечения на основе применения лекарственных средств биологического происхождения.

Согласно Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и федеральной целевой программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», с 2011 года предпринимается ряд мер по стимулированию организации производства биотехнологических субстанций. В частности, запущены мероприятия «Разработка технологии и организация производства биотехнологических жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств, не производимых отечественными производителями и не защищенных патентами иностранных компаний на территории Российской Федерации», а также «Разработка технологии и организация производства биотехнологических жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств, не производимых отечественными производителями и защищенных патентами иностранных компаний на территории Российской Федерации» и «Развитие биотехнологий и генной инженерии». Для успешной реализации этих мероприятий и выхода на производственные показатели, закрепленные в федеральной целевой программе необходимо, в первую очередь, проведение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по разработке технологии производства биотехнологических лекарственных средств. Помимо этого, в 2012 г. Правительство Российской Федерации утвердило комплексную программу развития биотехнологий до 2020 года.

Активное развитие наблюдается и в научном аспекте: сегодня биотехнологические науки занимают приоритетное место среди современных высоких технологий. Большое внимание ученые-исследователи уделяют разработке и созданию новых процессов и методов в медицинской биотехнологии. Среди них модификация микроорганизмов и животных, культивирование растительных клеток как источника получения новых лекарственных средств, конструирование молекул и биокаталитическая трансформация веществ. Последний процесс открывает широкие горизонты для построения новых фармацевтических процессов и разработки новых продуктов, существенно сокращая период окупаемости производства по сравнению с химическим синтезом.

О том, почему биотехнологии стали столь популярны в XXI веке, каковы их перспективы и текущем состоянии биофармпроизводства в России мы поговорили с экспертами.

Иван Александрович Василенко, вице-президент по науке ГК «Фармконтракт», д.х.н.:

Прежде всего, начнем с того, что понимают под биофармацевтическим продуктом. Лекарственные препараты можно разделить на препараты на основе веществ, полученных синтетическим путем, а так же препараты на основе веществ выделенных из биологических источников. Разработку и производство лекарственных препаратов на основе биологического сырья (животные, микроорганизмы, растения) относят к биофармацевтике. Строго говоря, типично биофармацевтическими продуктами можно назвать и антибиотики, которые выделяются из биологических ис-

И.А. Василенко

точников. Такие препараты объединяют под общим названием биофармацевтические препараты.

Особенность биофармацевтических препаратов – высокая вариабельность качества субстанций, связанная со сложностью технологических процессов производства субстанций, в связи с чем к биофармацевтическим препаратам предъявляют повышенные требования при разработке и регистрации таких лекарственных средств. Производство биофармацевтической продукции основано на достижениях биотехнологии генной инженерии, геномики и протеомики. Биотехнологическая промышленность имеет давнюю историю: производя пиво, сыры, вино, дрожжи, хлебопекарные изделия, продукты молочнокислого брожения, люди не отдавали себе отчета в том, что они задействуют в этом процессе биотехнологии. Понятие «биотехнология» возникло в 60-х годах прошлого столетия. На третьем съезде Европейской ассоциации биотехнологов (Мюнхен, 1984 г.) голландский ученый Е. Хаувинк разделил историю биотехнологии на пять периодов или эр:

1. Допастеровская эра (до 1865 г.) – использование спиртового и молочнокислого брожения при получении пива, вина, хлебопекарных и пивных дрожжей, сыра. Получение ферментированных продуктов и уксуса.
2. Послепастеровская эра (1866–1940) – производство этанола, бутанола, ацетона, глицерина, органических кислот и вакцин. Аэробная очистка сточных вод. Производство кормовых дрожжей.
3. Эра антибиотиков (1941–1960 гг.) – производство антибиотиков путем глубинной ферментации. Культивирование растительных клеток, получение вирусных вакцин. Микробиологическая трансформация стероидов.
4. Эра, основанная на внедрении в производство достижений генной инженерии. Использование генной и клеточной инженерии для целей получения биотехнологической продукции.

Кто создал производство вина, пива, сыра, кисломолочных продуктов, этанола, история умалчивает. Гораздо больше повезло авторам открытия антибиотиков, им присуждены Нобелевские премии, они остались в истории. Такая же ситуация сложилась и позже в отношении авторов-разработчиков технологии производства биофармацевтической продукции.

Антибиотики были открыты в начале 40-х годов. В 1944 году были применены антибиотики в клинических условиях. В настоящее время от открытия молекулы до клинического применения проходит более десяти лет, в военное время весь период разработки, клинических испытаний занимал не более четырех лет. К 40-м годам относится и создание технологии производства антибиотиков. Необходимо отметить, что первооткрыватели пенициллина не смогли ни в Англии, ни в Советском Союзе разработать технологию и создать производство, это удалось сделать в США. В Советском Союзе так же не удалось в это время организовать массовое производство пенициллина. Переговоры о продаже (передаче) технологии велись на межправительственном уровне.

То есть к 1944 году можно отнести и создание технологии производства биофармацевтических препаратов – антибиотиков, хотя сам термин «биофармацевтические препараты» появился гораздо позже. Все элементы оборудования в то время были заимствованы из арсенала химической промышленности. По важности разработка технология производства антибиотиков сравнивалась с масштабностью атомного проекта, реализованного в те же годы. Важно отметить, что пенициллин в свое время не был запатентован А. Флемингом – это было осознанное решение ученого. Технология производства была запатентована компанией Pfizer.

Первооткрыватели пенициллина для наработки антибиотика для исследовательских целей использовали лабораторную технологию – выращивание культуральной среды в плоских стеклянных колбах емкостью 2,5 л – «матрасах». Разработкой промышленной технологии ферментацией занимались химики-технологи. Процессы массообмена, теплообмена, кинетика процесса были такими же, как и в химических процессах синтеза. Неудивительно, что многие технологические стадии были позаимствованы из химической промышленности. История создания технологии производства пенициллина подтверждает тезис, что компетенции и знания ученого, ответственного за открытие действующего вещества, и технологов, занятых разработкой технологии процесса, совершенно различны.

Одним из первых биологических продуктов на основе белков, представленных на рынке США, был белок крови, так называемый фактор VIII (для лечения гемофилии). Первые продажи этого препарата датируются 1966 годом. Фактор VIII, отвечающий за нормальное свертывание крови, был изготовлен из крови человека, полученной от доноров. Это была самая ранняя регистрация FDA современного биотехнологического продукта, предназначенного для терапевтических целей.

В 1978 году компанией Gentech начато производство рекомбинатного инсулина человека, позднее продукт и технология были переданы компании Eli Lilly&Co.

Лекарственные средства, получаемые биотехнологическим путем, к которым был применен термин «биофармацевтика» (Biopharmaceuticals), полу-

чили разрешение на производство в конце 80-х гг.: инсулин, затем гормон роста для лечения карликовости-соматотропин.

Первой генно-инженерной вакциной, одобренной для использования в Соединенных Штатах, была вакцина против гепатита-В, получившая одобрение в 1986 году. Вакцина была создана путем вставки части вируса гепатита-В в клетки дрожжей. Моноклональные антитела (МКА) и альфа-интерферон были одобрены для терапевтических целей в 1986 году. Эритропоэтин (ЭПО), который должен был стать крупнейшим продуктом биотехнологии, получил первое официальное утверждение FDA в 1989 году.

В США биологический продукт определяется как «вирус, терапевтические сыворотки, токсин, антитоксин, вакцины, кровь, компоненты крови или производное, аллергенные продукты или аналогичный продукт, применимые к профилактике, лечению заболевания или состояния человека».

К настоящему времени зарегистрировано более пятисот биофармацевтических препаратов, и число их растет ежегодно на 50–60 препаратов. Объем продаж биофармацевтической продукции к настоящему времени в мире превысил 100 млрд долларов США в год.

Большинство биопрепаратов представляют собой сложные смеси, которые нелегко определить или охарактеризовать. В 1944 году был произведен антибиотик пенициллин, химическая структура которого была установлена только к началу пятидесятых годов. Биологические продукты отличаются от обычных лекарств тем, что они, как правило, термочувствительны и восприимчивы к микробному загрязнению.

Существуют потенциальные риски в производстве биофармацевтической продукции, связанные с загрязнением клетками-хозяина. Наличие таких загрязнений может привести к аллергическим реакциям и другим иммунопатологическим действиям. Неблагоприятные эффекты, связанные с загрязнениями нуклеиновыми кислотами являются теоретическими, но включают в себя потенциальную интеграцию в геном хозяина. Для продуктов, полученных из насекомых, растений и клеток млекопитающих, или трансгенных растений и животных может быть дополнительный риск вирусных инфекций.

Дмитрий Михайлович Кулиш, директор консалтинговой компании DrugDevelopment.Ru:

Биофармацевтика сегодня является ключевым сегментом фармацевтической отрасли: здесь и лекарственные средства, спасающие жизни, и самые дорогие и продающиеся лекарственные средства (что не всегда аналогично первой группе), и самые сложные технологии, и самые современные производственные площадки. Биофармацевтика находится в постоянном

Д.М. Кулиш

движении, на которое влияют мириады факторов: от науки и технологии до рыночных тенденций и государственной политики. Для понимания процессов, происходящих в биофармацевтической отрасли, необходимо разбираться не только в научных, технологических и клинических аспектах происходящего, но и в структуре рынка, деятельности основных игроков и их стратегии. Мы не будем разбирать аспекты технологий и клинической практики, но сосредоточимся на создании путеводителя по игрокам российской биофармацевтики и прогнозе дальнейших направлений развития отрасли.

Начнём с того, что само определение биофармацевтики раздвоено: на него по-разному смотрят технологи и бизнесмены. Для технолога-биофармацевтика – это продукт или процесс, основанный на культивировании (ферментации) рекомбинантного (генноинженерного) микроорганизма. То есть самый простой способ понять, имеем ли мы дело с биофармацевтикой – поискать в технологическом процессе ферментёр с культуральной жидкостью, в которой растёт рекомбинантный микроорганизм. Если такого ферментера и микроорганизма в производственном процессе нет, то мы вряд ли имеем дело с биофармацевтикой. Граница зачастую тонка: некоторые важные ферментационные продукты получаются из природных, а не рекомбинантных биомасс, например антибиотики, кормовые белки, пробиотики, поэтому их к биофармацевтике не относят. А вот вакцины, гормоны и продукты фракционирования крови относят

к биофармацевтике по причине сложности их производства и контроля качества. О них то я и расскажу подробнее.

Но это только одна сторона вопроса. В отличие от биотехнологов российские бизнесмены, то есть коммерческие фармацевтические компании, вынуждены воспринимать биофармацевтику под другим углом, продиктованным регуляторными аспектами российского фармацевтического законодательства и государственной политики. Согласно ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств» в России требуются локальные клинические испытания для всех вновь регистрируемых лекарственных средств за редкими исключениями. При этом, согласно директивам Европейского медицинского агентства по лекарственным средствам (EMA), которых российские регуляторы обоснованно придерживаются, даже воспроизведённое биофармацевтическое лекарственное средство (обозначаемое термином «биосимиляр») не может быть зарегистрировано только на основании коротких исследований биоэквивалентности, как это разрешено для твёрдых лекарственных форм – для биофармацевтических лекарственных средств требуется длительное сравнительное исследование эффективности лекарственного средства. Таким образом, отечественный производитель, который сам биофармацевтикой не занимается и дорогостоящее ферментационное производство не строит, а планирует производить ГЛФ стерильным розливом из импортной биофармацевтической активной фармацевтической субстанции (АФС), обязан осуществить длительные и дорогостоящие клинические испытания, которые по бюджетам настолько удорожают проект, что делают его уникально затратным. Эти затраты в процессе бизнес-планирования также называются словом «биофармацевтика», что создаёт некоторую путаницу. Компания может стать «биофармацевтической» вовсе не имея дорогого сложного ферментационного производственного подразделения, но честно занимаясь не менее сложным и важным стерильным розливом или лиофилизацией биофармацевтической АФС, которая была произведена за рубежом ферментационными методами, а также последующими сложными клиническими испытаниями. Несмотря на возникающую терминологическую путаницу, мы не возражаем против определения такой компании как «биофармацевтической». Тем не менее, в этом обзоре мы прежде всего отдельно выделим компании, развивающие в России ферментационные производства как «истинно биофармацевтические». Условно обозначим их как компании «полного цикла» (ПЦК) и отделим от компаний, занимающихся «розливом и развитием» (РРК).

Необходимо настоятельно отметить, что РРК также важны для российской фармацевтики, как и ПЦК. Во-первых, большинство производств биофармацевтических АФС настолько затратно, что отдельное их производство в России оказывается вопиюще экономически нецелесообразным. Во-вторых, процессы трансфера технологии (ТТ) стерильного розлива, контроля качества (КК) и клинических испытания (КИ) биофармацевтического лекарственного средства (ЛС) значительно сложнее и затратнее таковых процессов, применимых к низкомолекулярным ЛС. Поэтому РРК создают в Росси столь же важные технологические и экономические компетенции и экологические ниши, как и ПЦК. Условно говоря, производителю ЛС, который уже научился проводить ТТ, КК и КИ биофармацетических лекарственных средств, гораздо легче перейти к созданию собственных биофармацевтических АФС, когда на то настанет экономическая целесообразность. И в этом смысле РРК так же важно для отечественной фармацевтики и экономики, как и ПЦК.

И ПЦК, и РРК являются важными элементами государственной политики локализации фармацевтических производств в России – и те и другие будут неограниченно долго присутствовать на отечественном рынке. Политикой российских государственных органов сегодня является создание системы преференций для «локализованного» производства, направленной на развитие отечественных компетенций и центров производства. «Локальное» производство определяется сегодня как стерильный розлив (лиофилизация) любой АФС, пусть даже импортной. То есть необязательно быть ПЦК и осуществлять ферментационное производство АФС, чтобы считаться отечественным («локализованным») производителем – по сегодняшним законам РРК – это столь же локальные производства, как и ПЦК. Мы поддерживаем такую политику, считаем её социально- и экономически-полезной для российского общества и здравоохранения, поскольку и ПЦК, и РРК создают важные компетенции и центры производства. Уверены, что и в дальнейшем такой подход не изменится и статус «локального» производителя сохранится и за ПЦК, и за РРК. При этом ПЦК очевидно будут экономически обыгрывать РРК в цене АФС, что создаст именно тот свободно-рыночный механизм, который позволит развивать российскую фармацевтику по эффективному свободно-рыночному пути, а не по неэффективному пути государственных монополий.

Сложности и тонкости регуляторных и рыночных вопросов, связанных с российской биофармацевтикой, ПЦК и РРК, многочисленны. Тем не менее, проиллюстрируем сложность темы обсуждением одного из самых горячих текущих регуляторных вопросов.

Рассмотрим РРК, которая провела качественный ТТ и организовала качественный КК зарубежного биофармацевтического ЛС, имеющего регистрацию

в Российской Федерации, на отечественную производственную площадку. Теперь эта РРК намеревается внести вторую площадку в существующее регистрационное удостоверение (РУ). Необходимо ли в этом случае снова проводить КИ? Ответа на этот вопрос не знает никто, и всех эта тема очень занимает. Единственный пример такого проекта на сегодня – это регистрация отечественной производственной площадки пневмовакцины компании Pfizer компанией «Петровакс». Эта регистрация была одобрена без дополнительных клинических испытаний. Однако после этой регистрации вышло письмо-разъяснение МЗСР № 20-2/10/1-1040 от 02.03.2016, требующее в случае внесения новой производственной площадки «…проведения исследования сопоставимости по показателям качества, эффективности и безопасности». Рынок ждёт следующих примеров развития этой важной темы.

Ландшафт мировой биофармацевтики

Таблица 1.

Основные лекарственные средства мировой биофармацевтики

Синим отмечены продукты, производящиеся культивированием рекомбинантных микроорганизмов. Жёлтым – макромолекулы, выделяемые из природных источников. Красным – малые молекулы, выделяемые из природных источников.

Таблица 1 описывает основные биофармацевтические лекарственные средства мирового рынка. Это именно рыночные продукты. Есть немалое количество молекул, которые могут производиться с помощью биофармацевтических технологий и даже имеют доказанный терапевтический эффект, но по той или иной причине не нашли применение в мировой клинической практике. Хочется отметить, что если биотехнологу-разработчику кажется, что его молекула всем нужна, а рынку кажется, что не нужна, то побеждает обычно рынок. Как и многие другие отрасли, биофармацевтика определяется не столько наукой, сколько рынком. Лекарственные средства, хорошо продающиеся в мире, как правило, хорошо продаются, а значит, и развиваются в России. Что неудивительно, поскольку обширный мировой опыт обуславливает доверие и принятие пациентов и врачей. Биофармацевтические продукты, получившие признание на рынке, составляют «платформу» мировой биофармацевтики. Понимание этой платформы необходимо, поскольку именно на ней растёт и развивается отечественная биофармацевтика. «Глобальная платформа» мировой биофармацевтики состоит из следующих продуктовых групп:

- Моноклональные антитела (МКА).
- Гормоны:
  - ✓ инсулин,
  - ✓ соматотропин,
  - ✓ ФСГ,
  - ✓ терипаратид.
- Цитокины:
  - ✓ интерферон-альфа,
  - ✓ интерферон-бета,
  - ✓ интерферон-гамма,
  - ✓ интерлейкин.
- Ростовые факторы:
  - ✓ ЭПО,
  - ✓ КСФ.
- Факторы коагуляции: факторы VII, VIII, IX, X.
- Вакцины, полученные из природных источников.
- Рекомбинантные вакцинные антигены.
- Компоненты плазмы крови.

Попытки отечественных биотехнологов выйти за рамки «глобальной» платформы, увы, пока не увенчались успехом. Например, инновационное отечественное клинически-полезное генно-терапевтическое лекарственное средство «Неоваскулген» компании «ИСКЧ» так и не было принято отечественным рынком во многом из-за того, что оно не признано в мире. Эта история служит отечественным разработчикам уроком на тему того, как сложно выйти за границы «платформы». Можно посетовать, что глобальная «платформа» обрекает российскую биофармацевтику на «дженериковый» путь развития, то есть на создание биосимиляров. Это, отчасти верно но не надо этого факта стесняться или чураться. Как я отметил, создание современного биосимиляра требует столь высокой экспертизы и финансирования, что неминуемо двигает российскую фармацевтику и экономику вперёд. Кроме того, почти все российские компании, преуспевшие в создании биосимиляров, быстро пере-

ходят на новый уровень сложности и создают улучшенные аналоги биофармацевтических лекарственных средств, которые уже обретают статус патентованных инновационных молекул, по-прежнему оставаясь в рамках «глобальной платформы». Эту тенденцию можно проиллюстрировать следующими примерами:

- «Р-Фарм» разрабатывает и продвигает улучшенные инновационные варианты трастузумаба (коньюгат «Бейодайм»), деносумаба (RPH-203), гетеродимерного биспецифического RPH-104 и тоцилизумаба (олокизумаб).
- «Генериум» разрабатывает улучшенный инновационный вариант бевацизумаба («Варизацумаб»).
- «Биоинтегратор» разрабатывает коньюгированный ритуксимаб.

Российские производители биофармацевтической продукции полного цикла (ПЦК)

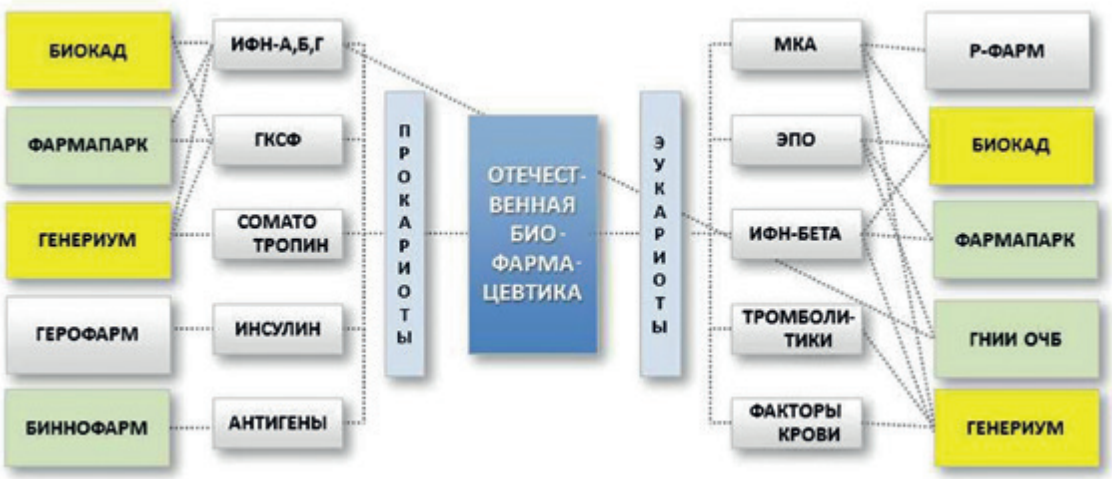
Как было уже отмечено, ключевыми игроками биофармацевтики являются ПЦК, которые развивают собственное ферментационное производство биофармацевтических АФС. Не вдаваясь в технологические подробности, необходимо отметить, что биофармацевтические технологии делятся на две разные вселенные: эукариотическую и прокариотическую. Эти два типа производства имеют разное оборудование, КК и даже идеологию развития. На сегодняшний день эукариотические технологии заметно сложнее и затратнее – ПЦК, развивающие их, находятся на переднем крае мировой фармацевтики. Таблица 2 схематически описывает ключевые российские ПЦК, работающие в обоих сегментах. Отмечу, что что в таблице 2 упоминаются не все игроки. Полный каталог всех российских ПЦК представлен в таблице 3.

Ключевой доминирующей российской биофармацевтической ПЦК является компания «Биокад» с несколькими производственными площадками, расположенными в Санкт-Петербурге и Московской области. «Биокад» совершил несколько революционных прорывов в отечественной биофармацевтике и чуть ли не единолично сформировал существующую экосистему:

- в 2006 году вывел на рынок первое значительное импортозамещающее биофармацевтическое лекарственное средство «Лейкостим» (МНН: филграстим). Была проделана огромная работа с врачами и пациентами, по результатам которой рынок впервые поверил, что в России можно заниматься настоящей биофармацевтикой;
- в 2009 году вывел на рынок более сложный «Ронбетал» (МНН: интерферон бета-1б). Волна на рынке поднялась ещё более высокая – «Биокад» снова доказал свои способности и позволил государству продемонстрировать важность и потенциал импортозамещения ключевых лекарственных средств;
- в 2008–2010 гг. сделал рискованную ставку на развитие отечественного производства МКА. В этот момент не только отечественный, но и глобальный потенциал этой группы лекарственных средств не были очевидны. Многие рассматривали этот проект «Биокада» как чрезмерный и необоснованный риск. Однако выпуск лекарственных средств Ритуксимаб и Трастузумаб утвердили впечатляющий успех «Биокада» и его роль как

Таблица 2.

Ключевые российские биофармацевтические ПЦК



Пунктирными линиями отмечены группы продуктов, на которых специализируются данные производители.

Таблица 3.

Полный список российских биофармацевтических ПЦК и их основных (не всех) продуктов

		ЭУКАРИОТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО					ПРОКАРИОТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО					ПРИРОДНЫЕ БИОМАССЫ	
ФЕРМЕНТАЦИЯ	КОМПАНИЯ	МКА	Эритро-поэтины	Тромбо-литики	Факторы крови	ИФН-б-1а	ИФН-а, г, б1б,	КСФ	Гормон роста	Анти-гены	Инсу-лины	Вак-цины	Компоненты крови
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ	БИОКАД	РИТУКСИМАБ, ТРАСТУЗУМАБ	ЭПО-А			ИФН-В1А	ИФН-А, ИФН-В1В	ГКСФ					
ЯРОСЛАВЛЬ	Р-ФАРМ	RPH-203											
ПОКРОВ	ГЕНЕРИУМ	БАРИЗАЦУМАБ		АЛТЕПЛАЗА	VII, VIII, IX	ИФН-В1А	ИФН-В1В	ГКСФ	ЭПО-А				МАСТЕРПЛАЗМА
МОСКВА	ФАРМАПАРК		ЭПО-В			ИФН-В1А	ИФН-А	ГКСФ					
ЗЕЛЕНОГРАД	БИННОФАРМ						ИФН-А			ВГВ			
МОСКВА	КОМБИОТЕК									ВГВ			
ПЕРМЬ, УФА, ЗОЛОСК, КИРОВ	НАЦИМБИО-МИКРОГЕН		ЭПО-В									АКДС, КП, ГРИПП	РОСПЛАЗМА
МОСКВА	И ЧУМАКОВА											ПОЛИО, ЭНЦЕФАЛ	
РЯЗАНЬ	ФОРТ											ГРИПП	
ХИМКИ	БИОИНТЕГРАТОР	РИТУКСИМАБ											
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ	ГНИИ ОЧБ		ЭПО-А				ИФН-А	ГКСФ					
НОВОСИБИРСК	ВЕКТОР-ФАРМ						ИФН-А	ГКСФ					
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ	ГЕРОФАРМ										ГИЧ		
МОСКВА	КАРДИОЦЕНТР			ПРОУРО КИНАЗА									
ОБОЛЕНСК	ФАРМАКЛОН						ИФН-Г						

Российские РКК, специализирующиеся на производстве биофармацевтических лекарственных средств на основе импортных АФС.

лидера российского и даже мирового биофармацевтического рынка, одинаково развитого как в прокариотических, так и в эукариотических технологиях разных форматов.

Второй ключевой и системообразующей российской биофармацевтической ПЦК стала компания «Фармапарк» (группа компаний «Биопроцесс», ныне группа «Фармстандарт»). «Фармапарк» одновременно с «Биокадом» запустил производство интерферона-альфа, филграстима и эритропоэтина и вскоре стал лидером по объёмам производства биофармацевтических АФС в материальном (не денежном) выражении. Сегодня «Фармапарк» остаётся лидирующим производителем ключевых биофармацевтических АФС и лекарственных средств, прежде всего, пэг-интерферона-альфа-2b.

Стремительно ворвавшийся в российскую биофармацевтику тандем «Мастерклон»-«Генериум» сфокусировался на производстве редких сложных продуктов: прокариотического соматотропина и эукариотических факторов крови, в которых «Генериум» в партнёрстве с «Фармстандартом» быстро достиг доминирующего положения на рынке. Оригинальным инновационным продуктом стал рекомбинантный туберкулёзный аллерген, который продемонстрировал, что в России возможны удачные биофармацевтические инновации. В Покрове было построено производство, уникальное не только по технологическим мощностям, но и по инфраструктурной организации.

Важными и яркими биофармацевтическими ПЦК являются ГНИИ ОЧБ и «Биннофарм», осуществляющие как прокариотическую, так и эукариотическую ферментацию. ГНИИ ОЧБ долгое время являлся лидирующим российским производителем важнейшей биофармацевтической АФС эритропоэтина, а «Биннофарм» – поверхностного антигена гепатита В и соответствующей вакцины. Сегодня обе организации перефокусируются на современные МКА и инновационные рекомбинантные антигены.

Крупнейшая российская фармацевтическая компания «Р-Фарм» начала свою деятельность в биофармацевтике не с производства, а с клинических испытаний и долгое время оставалась в рядах РРК. Однако «Р-Фарм» всегда демонстрировало своё стремление к полной интеграции и осенью 2016 года вошла в ряды отечественных биофармацевтических ПЦК, открыв современнейшее производство МКА я Ярославле.

Ключевой российской ПЦК стала компания «Герофарм», которая много лет развивала сложнейшее ответственейшее производство генноинженерного человеческого инсулина и вышла на выдающиеся технологические показатели эффективности и качества.

Важным и ярким игроком российской биофармацевтики был и остаётся государственный холдинг «Микроген», снабжающий отечественное здравоохранение качественными вакцинами. Сегодня «Микроген» вошёл в состав холдинга «Нацимбио», где наме-

ревается продолжить развитие новых продуктов и производственных линий.

Уникальные достижения в производстве вакцин полного цикла продемонстрировали Институт Полиомиелита им. Чумакова и НИВС в Красном Селе: обе организации создали современное производство, а Институт им. Чумакова даже вышел на международные рынки, показав редкий пример удачного развития экспортного бизнеса в России. Тем не менее, международные потребители отмечают недостаточное развитие продуктовых досье Института им. Чумакова, что ещё раз доказывает, что сам факт создания ферментационного производства ещё не делает организацию конкурентноспособной. РРК с хорошими досье может быть полезнее для отечественной фармацевтики, чем ПЦК с неоптимальными досье.

Отдельно хочется отметить такую важнейшую нишу биофармацевтической отрасли, как фракционирование плазмы донорской крови. Технология сложна и затратна, но необходима для России. Такое производство развивает «Генериум» на площадке «Мастерплазма». Также была предпринята неудачная попытка организовать такое производство на площадке «Росплазма». Сейчас площадка «Росплазма» передана «Нацимбио» и мы надеемся, что проект получит конструктивное развитие.

Таблица 3 обобщает все известные ПЦК в России и отмечает их ключевые продукты. Обращаю внимание, что продуктов у каждой компании гораздо больше. Среди ПЦК, упомянутых в таблице 3, хочется отметить:

- группу компаний «Вектор», старейшую российскую биофармацевтическую ПЦК с впечатляющей научной базой и широкими возможностями разработки;
- компанию «Биоинтегратор», участника группы «Химрар», которая проводит клинические испытания Ритуксимаба и его современнейших коньюгатов;
- компанию «Комбиотек», ведущего российского производителя вакцины против гепатита В;
- завод Кардиоцентра РАМН, первого российского производителя тромболитика Урокиназы;
- компанию «Фармаклон», уникального отечественного производителя интерферона-гамма;
- компанию «Форт», самого современного и качественного отечественного производителя гриппозной вакцины.

Таблица 4 перечисляет все российские фармацевтические компании, которые согласно информации ГРЛС Росздравнадзора по состоянию на октябрь 2016 ведут деятельность по клиническим исследованиям ключевых биофармацевтических лекарственных средств. В список не попали компании, ведущие разработки нишевых лекарственных средств с недоказанным рыночным потенциалом, а также зарубежные компании. Основными участниками этого списка логично являются уже знакомые нам ПЦК, но есть также и мощные игроки без собственной ферментации, прежде всего «Сотекс», «Верофарм», «Петровакс», «Нанолек», «Фармстандарт», «Форт» и «Медсинтез». Специфическими игроками среди отечественных биофармацевтических РРК являются заводы, созданные крупными зарубежными компаниями. Собственно создание таких производств являлось одной из стратегических целей государственной политики локализации. Пока, правда, он идёт только в наиболее политизированной части биофармацевтического рынка, генноинженерном инсулине, где собственные РРК в России создали два мировых гиганта, «Санофи» и «Ново Нордиск», а третий гранд «Эли Лилли» объявила о создании такого РРК в партнёрстве с «Р-Фарм». Тем не менее, процесс уже не остановить, и мы в скором времени увидим РРК, организованные зарубежными гигантами в ещё одном весьма политизированном сегменте биофармацевтики – вакцинах. Так, «Санофи» объявила о локализации пентавакцины на «Нанолеке», а Pfizer локализовал пневмовакцину на «Петроваксе».

Перспективы развития отечественной биофармацевтики

При рассуждениях о будущем и перспективах отечественной биофармацевтики невозможно не отметить плохие и хорошие новости. Хорошими новостями является тот факт, что ведущие отечественные биофармацевтические компании полны энергии и нацеленности на будущее. У каждой компании имеется стратегия, по которой она неуклонно двигается:

- «Биокад» продолжает выводить на отечественный и мировой рынок всё новые биосимиляры, уверенно опираясь на свою великолепно отлаженную разработческую и регуляторную структуру. При этом «Биокад» ведёт обширный НИОКР создавая как улучшенные версии известных лекарственных средств, так и инновационные молекулы.
- «Р-Фарм» сосредоточилась на инновационных и улучшенных биофармацевтических продуктах, по которым компания ведёт многочисленные высокопрофессиональные клинические исследования в России и за рубежом.
- Многие компании начали амбициозные проекты по разработке следующего поколения биосимиляров, таких как компактные, биспецифические и коньюгированные антитела, а также совсем новые современные продукты, такие как малые РНК и генно-терапевтические ДНК.

Таблица 4.

Российские РРК

МЕХАНИЗМ	ЗАБОЛЕВАНИЕ	МНН				
иммунотерапия	ВГС	пегинтерферон-альфа	БИОКАД	ФАРМАПАРК	ФАРМАКТИВ	ФОРТ
иммунотерапия	ВГС	пегинтерферон-гамма	ФАРМАКЛОН			
замещение	анемия	эритропоэтин	ФАРМАПАРК	БИННОФАРМ	ГНИИ ОЧБ	ВЕРОФАРМ	СОТЕКС
замещение	анемия	метоксиЭПО	ФОРТ			
замещение	анемия	дарбепоэтин	БИОКАД	ФАРМАПАРК		
стимуляция	химиотерапия	пегфилграстим	БИОКАД			
замещение	дварфизм	соматотропин	ФАРМСТАНДАРТ			
замещение	диабет	генноинженер инсулин	ГЕРОФАРМ	МЕДСИНТЕЗ	САНОФИ	НОВО НОРДИСК
иммунотерапия	вакцины	вакцины	МИКРОГЕН	И ЧУМАКОВА	ПЕТРОВАКС	НАНОЛЕК
иммунотерапия	Рассеянн Склероз	интерферон-бета-1б	БИОКАД	ГЕНЕРИУМ		
иммунотерапия	Рассеянн Склероз	интерферон-бета-1а	СИА Инт	БИОКАД		
иммунотерапия	Рассеянн Склероз	глатирамер	Ф-СИНТЕЗ	Р-ФАРМ	БИОКАД	
рец ГлПро	антитромботик	абциксимаб				
CD20	лимфомы	ритуксимаб	БИОКАД	ГЕНЕРИУМ	НАНОЛЕК	БИОИНТЕГРАТОР
CD25	трансплантация	базиликсимаб				
ФНО	РА и аутоиммуные	инфликсимаб	БИОКАД	ПЕТРОВАКС		
HER2	рак груди	трастузумаб	БИОКАД	Р-ФАРМ		
ФНО	РА и аутоиммуные	адалимумаб	БИОКАД			
VEGF	твёрдые опухоли	бевацизумаб	БИОКАД	ГЕНЕРИУМ		
IgE	астма и аутоимм	омализумаб				
а-интегрин	РС	натализумаб				
RANK	остеопороз	деносумаб	Р-ФАРМ			
IL-6	РА и аутоиммуные	тоцилизумаб	Р-ФАРМ			

Зелёным цветом отмечены компании, имеющие действующие регистрационные удостоверения, жёлтым – ведущие клинические испытания, красным – ведущие клинические испытания улучшенных версий ЛС.

- Активно развиваются новые современные технологии культивирования и очистки.
- Активно развиваются клеточные технологии, прежде всего персонализированные вакцины и химерные антигенные рецепторы. Их обычно не относят напрямую к биофармацевтике, а выделяют в отдельный сегмент.

Крайне важным фактором, стимулирующим развитие этого направления в нашей стране, является активная государственная поддержка. Важность и действенность государственной поддержки отечественной фармацевтики была убедительно доказана в 2010–2015 гг. при реализации федеральной целевой программы «Фарма-2020», и теперь отрасль с надеждой ожидает продолжения и расширения государственного участия.

Плохими новостями, от которых не удаётся спрятаться, является огромная зависимость российской фармацевтики от мировых тенденций и международных компаний, известных под обобщённым именем Big Pharma. Только у этих компаний сегодня имеются ресурсы, достаточные для глубочайшей разработки новых лекарственных средств.

Самым печальным примером является судьба генно-терапевтического лекарственного средства «Неоваскулген», разработанного российской компанией «ИСКЧ». Препарат является инновационной разработкой мирового уровня и продемонстрировал убедительную клиническую эффективность при лечении заболеваний, угрожающих жизни пациентов. Несмотря на это, «Неоваскулген» так и не смог пробиться ни в государственные закупки, ни на розничный рынок. Основной причиной считается то, что на мировом уровне эти технологии ещё не приняты и врачи просто не поверили в «отечественную новинку». Вторым примером подобных же проблем является инновационный цис-пэг-интерферон компании «Биокад», судьба которого оказалась менее печальной, и он достиг определённого уровня продаж. Таким образом, развитие и создание инновационных лекарственных средств отечественной биофармацевтики нельзя рассматривать как чисто рыночные коммерческие проекты. Скорее, они заслуживают общественного внимания как проекты, развитие которых отвечает ключевым интересам

россиян, а значит, должно быть поддержано на всех уровнях общества.

Подводя итоги, отмечу, российская биофармацевтика развивается семимильными шагами и имеет хорошее будущее. Впереди ещё много препятствий, но и много возможностей и ярких достижений. Необходимо не только заниматься популярным делом разработки новых лекарственных средств, но и посвящать всё больше усилий менее ярким, но столь же экспертным, затратным и абсолютно необходимым темам установления надлежащих производственных практик, контроля качества, продуктовых досье и клинических испытаний.

Виктор Александрович Дмитриев, генеральный директор АРФП:

Что касается перспективы внедрения на российских заводах биотехнологий при производстве лекарственных средств, то тут территориальная принадлежность не имеет значения. Это разные способы производства: химический синтез и биотехнологии. Все зависит от того, на что нацелены компании. Обычно они развиваются по тому или иному пути. Есть, конечно, попытки совмещения, но на одном заводе это совместить крайне сложно. Например, у компании «ФармЭко» есть завод «ЗиО-Здоровье» в Подмосковье, который занимается вопросами химического синтеза, и есть завод в Рязани, который занимается биотехнологиями. Соответственно, на разных площадках у них разный способ производства.

Безусловно, есть и удачные примеры производства отечественных продуктов с помощью биотехнологий. Такие компании, как «Биокард», «ФармЭко», «Генериум» и многие другие. В целом эксперты говорят, что за биотехнологиями будущее. Это не значит, что завтра с рынка уйдут все препараты химического синтеза. Они нужны, они составляют львиную долю среди препаратов низкого ценового сегмента. Но если мы говорим об инновациях, то в большинстве своем они биотехнологического производства.

В.А. Дмитриев

Биотехнологические препараты достаточно дорогие. И здесь есть определенный дисбаланс. Сейчас ожидать, что все препараты станут биотехнологическими не приходится. Нет большой потребности рынка в этом. Нет возможностей системы здравоохранения, потому что за все это надо платить. А, как мне известно, финансирование останется на уровне прошлого года. С учетом инфляции и подорожаний получится на 20–25% меньше, чем в этом году. Это как раз не повод для того, чтобы закупать дорогие препараты.

Также отмечу, что при производстве фармсубстанций (и не только биотехнологических) мы по себестоимости не проходим конкуренцию с Китаем, учитывая то, что китайский рынок гораздо больше. Как пример мы всегда приводим вакцинирование детей. У нас ежегодно вакцинируется 1 миллион новорожденных, а у них 100 миллионов. При разнице в 100 раз там, естественно, и ниже себестоимость.

За счет чего мы стали интересны, в том числе и для зарубежных компаний, это за счет изменения курса доллара. Этот кризис не только проблема, но и новые возможности. Себестоимость отечественных продуктов в долларах стала фактически в два раза дешевле, что привлекло новых инвесторов и заказчиков.

Что касается биотехнологических субстанций, то здесь процесс гораздо сложнее. Порой требуются граммы, не больше одного килограмма, чтобы обеспечить весь мир той или иной субстанцией. Поэтому мы имеем производство субстанций под конкретный продукт, который уже сегодня на рынке. Мне неизвестны случаи в нашей стране, чтобы биотехнологические субстанции производились куда-то на продажу и экспорт. Но и в принципе в мире таких случаев очень мало. В основном все производят под себя. И здесь надо сразу сказать почему говорят биоаналог, а не дженерик. Ведь невозможно воспроизвести биотехнологический препарат. Можно создать аналогичный, но это будет не идентичный препарат.

Российские компании, естественно, готовы инвестировать, если только будет потребность у рынка. Инвестировать только из-за галочки вряд ли кто-то будет. Есть ряд препаратов для которых, чтобы обеспечить мировой рынок, достаточно 1,5 кг фармацевтической субстанции в год. Из-за 50 г, которые требуются для российского рынка, никто отдельный завод строить не будет.

Сергей Александрович Шуляк, генеральный директор DSM Group:

Прежде всего определимся с понятиями. Биологические препараты – группа медицинских продуктов биологического происхождения, в том числе вакцины, препараты крови, аллергены, соматические клетки, ткани, рекомбинантные белки. Биологические пре-

С.А. Шуляк

параты на основе бактерий и других видов микробов состоят из живых или убитых микроорганизмов, отдельных их компонентов, специфических иммуноглобулинов, сывороток или их фракций; применяются также для профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней и являются объектом изучения иммунологии, микробиологии и эпидемиологии. Согласно определению Европейского агентства по лекарственным средствам (EMEA – European Medicines Agency), это иммунобиологические лекарственные средства, произведенные путем биотехнологических процессов с применением:

- технологии рекомбинантной ДНК;
- метода контролируемой экспрессии генов, кодирующих выработку биологически активных белков;
- метода гибрида и моноклональных антител, а также генотерапевтические и соматотерапевтические лекарственные средства.

Стоит отметить и наличие на фармацевтическом рынке такого понятия, как биосимиляр, под которым понимают биотехнологическое лекарственное средство, схожее с произведенным впервые (оригинальным) лекарственным средством и представленное на регистрацию после истечения срока действия патента оригинального лекарственного средства (similar biological medicinal product). Система допуска биоподобных препаратов в развитых странах строится на концепции «биоподобия», состоящей из пяти столпов – это полноценные сравнительные аналитические, доклинические и клинические исследования, фармаконадзор (с активным мониторингом безопасности) и соответствие производителя требованиям GMP. Сегодня в России отсутствуют специфические требования к регистрации биоподобных препаратов, клинические исследования проводятся не в необходимом объеме или отсутствуют вовсе, полноценного перехода на стандарты GMP в отрасли так и не произошло, а система фармаконадзора находится в процессе развития. Так, в ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств» до июля 2015 г. отсутствовали определения биотехнологического лекарственного средства и биосимиляра. Хотя, в законе присутствует определение иммунобиологических лекарственных препаратов, под которыми понимаются лекарственные препараты биологического происхождения, предназначенные для иммунологических диагностики, профилактики и лечения заболеваний. С 1 июля 2015 г. в ФЗ-61 внесены поправки в части определения для отдельных категорий лекарственных препаратов, которые включают и понятие «биологические лекарственные препараты». Согласно закону, биологические лекарственные препараты – лекарственные препараты, действующее вещество которых произведено или выделено из биологического источника и для определения свойств и качества которых необходима комбинация биологических и физико-химических методов. К биологическим лекарственным препаратам относятся иммунобиологические лекарственные препараты, лекарственные препараты, полученные из крови, плазмы крови человека и животных (за исключением цельной крови), биотехнологические лекарственные препараты, генотерапевтические лекарственные препараты. Также поправки в федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» устанавливают понятие биотехнологических лекарственных препаратов. Биотехнологические лекарственные препараты – лекарственные препараты, производство которых осуществляется с использованием биотехнологических процессов и методов (в том числе ДНК-рекомбинантной технологии, технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих биологически активные белки в прокариотах и эукариотах, включая измененные клетки млекопитающих), гибридомного метода и метода моноклональных антител.

Учитывая нормативно-правовые изменения в области регулирования рынка биопрепаратов, на сегодняшний день в России представлено 354 бренда этих продуктов, которые производит 189 компаний (таблица 5).

Безусловно, если проследить эволюцию биопрепаратов в российской фармацевтике, то с 2011 года произошел пусть и незначительный, но рост как в финансовых показателях, так и в упаковках:

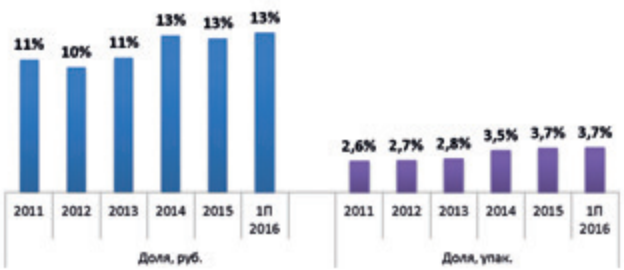


Таблица 5.

Биопрепараты на рынке России

354 бренда

189 производителей

Область	Структура
ЖКТ	Бактериальные препараты
	Лечение сахарного диабета
	Ферментные препараты
Нарушениях крови	Гемостатические препараты/ Антикоагулянты/ Стимуляторы эритропоэза
Нефрология и урология	Гонадотропины
Гормональной активность	Гормоны передней доли гипофиза
	Гормоны, расщепляющие гликоген
	Производные Вазопрессина
	Производные октоцина
Противомикробные биопрепараты	Вакцины/Иммуноглобулины
Онкология и иммунология	Иммунодепрессанты
	Интерлейкины
	Интерфероны
	Цитокины и иммуномодуляторы

Данный феномен можно объяснить тем обстоятельством, что в 2015 году по целому ряду биотехнологических препаратов из списка ЖНВЛП, поддержанных Минпромторгом России, истекала дата исполнения контракта.

Таблица 6.

Проекты организации производства биотехнологических препаратов из списка ЖНВЛП, поддержанные Министерством промышленности и торговли России

МНН	Группа препарата	Зарубежный производитель	Российский производитель	Дата исполнения контракта
Вакцина гриппозная	иммунодепрессанты	Novartis	Р-Фарм	2014
Пегинтерферон альфа-2а	интерфероны	Roche	Р-Фарм	2014
Рамплизумаб	моноклональные антитела	Novartis	Р-Фарм	2015
Инсулин Аспарт	инсулины	Novo Nordisk	Р-Фарм	2015
Инсулин Гларгин	инсулины	Sanofi	Р-Фарм	2015
Инсулин Аспарт двухфазный	инсулины	Novo Nordisk	Биокад	2015
Энфувиртид	ингибиторы слияния	Roche	Ф-Синтез	2015
Микофеноловая кислота	иммунодепрессанты	Novartis	Ф-Синтез	2015
Глюкагон	гормоны	Novo Nordisk	ИБХ РАН	2014
Этанерцепт	иммунодепрессанты	Pfizer	Генериум	2014
Такролимус	иммунодепрессанты	Astellas Pharma	Ивакрино Фарма	2014
Фактор свертывания крови VIII	факторы свертывания крови	Baxter	Биокад	2015
Инсулин Лизпро	инсулины	Eli Lilly	ГЕРОФАРМ-Био	2015
Инсулин Лизпро двухфазный	инсулины	Eli Lilly	ГЕРОФАРМ-Био	2015
Диоксициклин	антибиотики	Astellas Pharma	Омутнинская научная опытно-промышленная база (ОНОПБ)	2014
Тобрамицин	антибиотики	Novartis	ОНОПБ	2014
Рифампицин	антибиотики	Recordati	ОНОПБ	2014
Медроксипрогестерон	гормоны	Pfizer	ОНОПБ	2015
Натамицин	антибиотики	Astellas Pharma	Р-Фарм	2014
Алтеплаза	фибринолитики (терапевтические ферменты)	Boehringer Ingelheim	НПЦ «Фармзащита»	2013
Пегинтерферон альфа-2b	интерфероны	Merck	НПЦ «Фармзащита»	2013
Фоллитропин альфа	гормоны	Merck KGaA	Биокад	2013
Имиглюцераза	терапевтические ферменты	Sanofi	МБЦ «Генериум»	2013
Цетуксимаб	моноклональные антитела	Merck KGaA	Р-Фарм	2015
Сеннозиды A и B	слабительные средства	GSK	ABBA РУС	2015
Фактор свертывания крови IX	факторы свертывания крови	Baxter	ИБХ РАН	2013

Тенденция пусть и незначительного роста биопродуктов на отечественном рынке выглядит довольно неплохо на фоне общемировой тенденции к снижению динамики развития биопрепаратов:

В то же время цена на биопрепараты по сравнению с другими лекарственными средствами, находящимися в обращении на рынке, в 4 раза выше!

Что же представляет из себя рынок биопрепаратов? Как я отметил в начале, по определению EMEA, рынок биофармацевтики включает в себя биотехнологические препараты и биосимиляры (рисунок 1). В 2015 году мы наблюдали рост доли биосимиляров за счет таких препаратов, как Ацеллбия, Превенар, закупаемых по госпрограммам, в 2016 году – Октофактор, Фейба. А основными производителями биопрепаратов в 2015 году были F.HOFFMANN-LA ROCHE, Sanofi, Merck, Novartis, Novo Nordisk, в продуктовом портфеле которых преобладающие позиции занимали биотехнологические препараты, и «Генериум», Pfizer, «Биокад», Baxter и Abbot, специализирующиеся на производстве биосимиляров.

Рисунок 1. Структура рынка биопрепаратов

По назначению структура биопрепаратов в 2015 годы выглядела следующим образом:

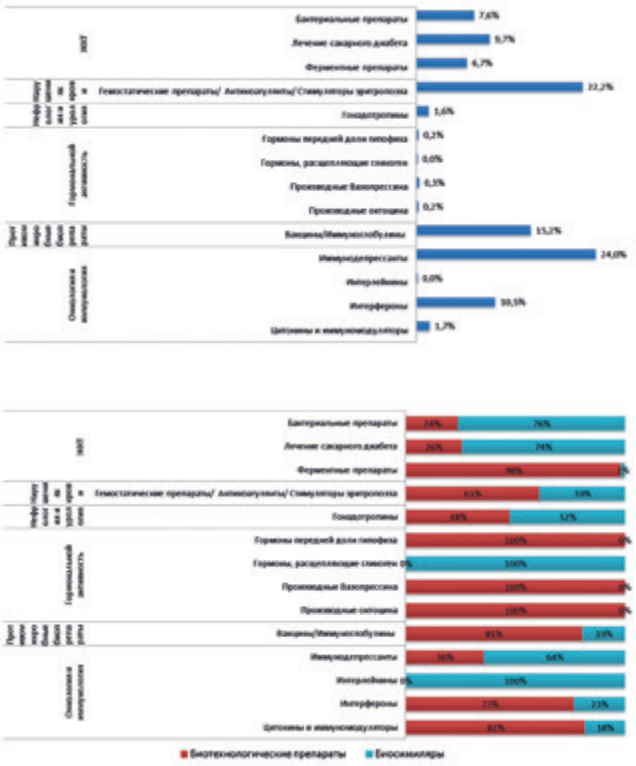


Рисунок 2. Структура биопрепаратов по назначению

В категориях «биотехнологические препараты», «биосимеляры» заметно преобладание во всех группах биотехнологических препаратов. Исключение составляли гормоны, расщепляющие гликоген, из группы гормональной активности и интерлейкины, применяемые в онкологии и иммунологии (рисунок 2).

Практически во всех группах биопрепаратов по назначению преобладают продукты иностранного

Рисунок 3. Структура биопрепаратов по происхождению

Таблица 7.

ТОП-3 производителя в каждой подгруппе

Группа биотехнологических препаратов	Подгруппа	Производитель	Доля в подгруппе, руб.
ЖКТ	Бактериальные препараты	NOVARTIS	32,6%
		PFIZER	22,1%
		TEVA	12,8%
	Лечение сахарного диабета	NOVO NORDISK	37,3%
		SANOFI	35,7%
		ELI LILLY	18,2%
	Ферментные препараты	ABBOTT	32,1%
		BERLIN-CHEMIE	29,0%
		SANOFI	10,5%
Нарушениях крови	Гемостатические препараты/ Антикоагулянты/ Стимуляторы эритропоэза	BAXTER	19,4%
		ГЕНЕРИУМ	10,1%
		SANOFI	8,4%
Нефрология и урология	Гонадотропины	MERCK	55,7%
		FERRING	18,7%
		Merck KGaA	7,8%
Противомикробные биопрепараты	Вакцины/ Иммуноглобулины	PFIZER	38,1%
		МИКРОГЕН	10,7%
		SANOFI	7,0%
Гормональной активность	Гормоны передней доли гипофиза	ФАРМСТАНДАРТ	81,9%
		NOVO NORDISK	8,5%
		ЕВРОФАРМ	4,7%
	Гормоны, расщепляющие гликоген	NOVO NORDISK	100,0%
	Производные Вазопрессина	FERRING	65,7%
		НАТИВА	27,1%
		APOTEX	6,4%
	Производные окитоцина	FERRING	57,9%
		МЭЗ	25,3%
		ЭЛЛАРА	10,8%
Онкология и иммунология	Иммунодепрессанты	F.HOFFMANN-LA ROCHE	41,7%
		БИОКАД	17,9%
		MERCK	13,3%
	Интерлейкины	БИОТЕХ	100,0%
	Интерфероны	ФЕРОН	19,0%
		LABORATORY TUTEUR	18,5%
		БИОКАД	12,6%
	Цитокины и иммуномодуляторы	ПОЛИСАН	46,8%
		БИОКАД	15,4%
		SANOFI	14,7%

происхождения. Исключения наблюдаются в биопрепаратах для онкологии и иммунологии (интерлейкины отечественного производства занимают 100% национального рынка).

Основными же российскими производителями (до 75% объема отечественных биопрепаратов) биопрепаратов являются такие компании, как «Биокад», «Генериум», «Фармстандарт», «Ферон», «Микроген», «Сотекс», «Отисифарм», «Фирн М», ФГУП «ПИПВЭ», «Полисан». Именно эти отечественные и ранее упомянутые зарубежные компании входят в ТОП-3 производителей основных подгрупп биопрепаратов (таблица 7).

Сергей Николаевич Быковский, президент ГК «Фармконтракт»:

Наиболее перспективное направление современной фармацевтики – это биофармацевтическая отрасль. То есть получение лекарственных средств из живых продуцентов посредством целенаправленного внесения дополнительной информации в их генетический материал. Наш холдинг это направление, связанное с биотехнологиями, открыл не так давно. Однако за несколько лет работы в области проектирования, строительства и оснащения фармацевтических предприятий, в т.ч. при организации линий биотехнологического производства, мы пришли к пониманию, что оснащение производственных линий современным оборудованием не гарантирует успех производства биотехнологического сырья и готовых лекарственных форм на его основе за указанный в ключевых показателях для отечественной фармпромышленности период. Причина кроется в отсутствии достаточных навыков и квалификации работы на модернизированном и оснащенном самыми современными высокотехнологичными системами производстве. В этой связи мы объединили усилия с лучшими учеными страны и американским производителем оборудования GE Healthcare, имеющим колоссальный опыт производства систем для биофармацевтических предприятий, и подготовили практическое пособие *«Красная» биотехнология»*.

Почему именно «красная» и что скрывается за этим названием? Согласно определению Всемирного форума по биологическим наукам (2003 г.), а также Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020года (утверждена Правительством Российской Федерации 24.04.2012 г.), термин «красная биотехнология» подразумевает использование биотехнологических процессов и методов в медицине (при создании биофармацевтических препаратов – белков, ферментов, антител для человека), а также в генной и клеточной терапии. В подготовленной книге (кстати, ее презентация состоится на выставке Pharmtech & Ingredients) мы сосредоточились на процессах организации производства именно этих продуктов, уделив пристальное внимание upstream (наращивание биоматериала) и downstream (выделение и очистка препарата из биоматериала с получением активной фармацевтической субстанции) процессам. Опираясь на накопленный опыт и рекомендации зарубежных стандартов FDA, ICH, ВОЗ, мы представили на страницах крайне актуального для российских фармпроизводителей издания практические кейсы по лабораторной разработке и отработке граничных условий каждой стадии R&D биопродукта, последующего трансфера лабораторной технологии и организации серийного производства биопродуктов. Существенное внимание в книге уделяется и контролю качества выпускаемых продуктов, что обусловлено стандартами GMP. Отличительной особенностью издания станет не просто презентация теоретического обоснования применения тех или иных методов производства, выбор того или иного оборудования, но пошаговое описание технологической схемы реализации проектов для получения моноклональных антител, биоаналога инсулина-гларгина, вакцин и фракционирование плазмы, а также многих других. Надеюсь, что книга окажется интересной и полезной для биотехнологов, связавших свою работу с фармацевтической промышленностью.

С.Н. Быковский

ОТКРЫТИЕ ЦЕНТРА ТРАНСФЕРА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЯРОСЛАВЛЕ

20 сентября 2016 года в Ярославле на базе Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского состоялось торжественное открытие Центра трансфера фармацевтических технологий имени М.В. Дорогова. Центр, расположенный в зоне индустриального парка «Новоселки», построен в рамках реализации федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по заданию Министерства образования и науки Российской Федерации.

В Ярославле в индустриальном парке «Новоселки» начал работу центр, специализирующийся на разработке лекарственных средств и технологий, их переносе на производственную базу заказчика. В торжественной церемонии открытия Центра трансфера фармацевтических технологий приняли участие заместитель министра промышленности и торговли Российской Федерации **С.А. Цыб**, директор департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **О.Н. Колотилова**, директор департамента лекарственного обеспечения и регулирования обращения медицинских изделий Минздрава России **Е.А. Максимкина**, директор ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Минпромторга России **В.Н. Шестаков**.

Приветствуя нового резидента ярославского фармацевтического кластера, **С.А. Цыб** отметил, что открытие Центра трансфера фармацевтических технологий на базе Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского – это следующий этап реализации государственной программы «Фарма-2020»: «Когда-то мы поставили себе задачу на базе крупнейших университетов нашей

страны создавать центры по разработке лекарственных препаратов. Очевидно, что Ярославль сегодня является одним из основных центров развития фармацевтических технологий: здесь создана хорошая научно-исследовательская база, за последние пять лет открыто много крупных производственных компаний, в том числе с участием иностранного бизнеса. Мне кажется, что Центр трансфера фармацевтических технологий будет являться центром проведения исследований не только в Ярославском регионе, но и в Российской Федерации в целом, а Министерство промышленности и торговли будет оказывать всестороннюю поддержку этому проекту». В продолжения выступления замминистра промышленности и торговли Российской Федерации исполняющий обязанности ректора ЯГПУ им. К.Д. Ушинского **Михаил Груздев** заметил, что университет – это крупный научный центр, в котором более 50 кандидатов наук, 63 доктора наук, шесть диссертационных советов: «Деятельность Центра направлена на разработку новых лекарственных форм и препаратов. Это направление исследований появилось в университете с начала 2000-х годов благодаря инициативе, усилиям, энергии и мудрости доктора химических наук, профессора Михаила Владимировича Дорогова, имя которого сейчас и носит центр».

Современный Центр трансфера фармацевтических технологий, введенный в эксплуатацию в июле 2016 года, представляет собой уникальный лабораторный корпус площадью 8500 м^2, спроектированный в соответствии с международными стандартами GMP и GLP. В нем расположены 14 химических и 8 аналитических лабораторий, участок масштабирования технологий производства активных фармацевтических субстанций, участок разработки технологий производства твердых лекарственных форм, виварий площадью 720 м^2, лекционные аудитории и конференц-залы. В готовности центра к активной работе по проведению полного цикла исследований в сфере разработки новых фармацевтических технологий и лекарственных форм высокие гости и представители СМИ смогли убедиться сами в ходе экскурсии по объекту. Центр полностью готов к реализации проектов по созданию инновационных мишень-специфичных биологически активных веществ, разработке химических технологий производства активных фармацевтических субстанций, технологий производства твердых лекарственных форм – таблеток и капсул, проведению доклинических исследований лекарственных средств на лабораторных животных, контролю качества лекарственных средств.

Строительство центра шло с 2012 года в рамках реализации федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Общий объем государственного финансирования был рассчитан на 4 года и составил 677 млн руб., включая расходы на проектные и строительные работы, а также закупку основного оборудования. В частности, для наработки опытно-промышленных партий активных фармацевтических ингредиентов в Центре трансфера технологий ЯГПУ им. К.Д. Ушинского силами ГК «Фармконтракт» осуществлена поставка и проведен запуск реакторных установок BUCHI Labortechnik и BuchiGlasUster, систем термостатирования Julabo Presto. На сегодняшний день создан необходимый кадровый и материально-технический потенциал для начала деятельности и успешного функционирования центра, который выходит на рынок R&D как организация, готовая оказывать широкий спектр производственных, опытно-конструкторских, технологических, научно-исследовательских, инфраструктурных, образовательных и прочих услуг фармацевтическим компаниям. Инфраструктура позволяет проводить НИОКТРы в широком спектре генеральных направлений инновационной и индустриальной фармацевтики и размещать локализованные производства.

МИНПРОМТОРГ РОССИИ ОТКРЫЛ ПРОЕКТНЫЙ ОФИС ПО ПРОДВИЖЕНИЮ ПРОДУКТОВ

В конце сентября 2016 года в рамках демонстрации результатов российских разработок, полученных в ходе реализации федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», была запущена программа продвижения отечественной продукции в формате проектного офиса. Основная задача проектного офиса – помощь российским разработчикам в анализе рынка, оценке перспективности и патентоспособности инновационных разработок, технологических возможностей и экономического потенциала для их масштабирования.

Впервые о проектном офисе заявил заместитель руководителя департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **Алексей Алехин** на форуме «Биотехмед», который прошел 26–27 сентября в Геленджике: «У нас порядка 300 проектов по доклинике прошли финансирование по «Фарме-2020». В части тех проектов, которые были профинансированы, мы сейчас запускаем новую программу, которая позволит нам отобрать наиболее перспективные», – отметил он. Однако идея создания подобной структуры возникла еще в конце июля 2016 г.: на заседании правительственной комиссии по импортозамещению представители производственных фармкомпаний подняли вопрос о необходимости ускоренной регистрации для инновационных разработок лекарственных средств. Председатель Правительства Российской Федерации **Дмитрий Медведев** подчеркнул важность сокращения дистанции между передовыми решениями в сфере медицинских технологий и фармпромышленностью. По его словам, между научными изысканиями и их переходом в практическую сферу дистанция пока достаточно велика. Минпромторгу, Минздраву, Минэкономразвития России было поручено включить в целевые показатели эффективности реализации государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013–2020 годы данные о выводе на рынок в 2016–2020 годах разработанных в рамках программы лекарственных препаратов и медицинских изделий.

Критерии и методика оценки инновационных проектов (и/или продуктов) будут разработаны специально с учетом специфики самих проектов и целевого рынка. Эти критерии позволят оценить проект системно с учетом тех требований, которые предъявляют инвесторы к информации о разработках. Они должны демонстрировать уровень инновационности, маркетинговые/рыночные показатели возможностей проекта и удовлетворенности потребностей целевого рынка (потенциальная емкость рынка, распространенность проблемы, уровень конкуренции), потенциальную коммерческую эффективность (особенности технологии, сырья, возможности производства с учетом текущего технологического оснащения площадок), а также внутрирыночный и экспортный потенциал разработки.

Помимо выработки критериев, ведется и отбор потенциально интересных для инвесторов проектов. Как отметил на форуме «Биотехмед» **Алексей Алехин**, на сегодняшний день ведется работа по формированию списка разработок, которые будут представлены экспертам из научного и бизнес-сообщества, регуляторных органов для оценки инвестиционного потенциала. В том числе данные разработки будут представлены и вниманию венчурных фондов, институтов развития, способных включиться в работу по дальнейшему их масштабированию и продвижению на рынок.

На завершающей стадии формирования находится экспертная комиссия. «Мы не ограничиваем команду определенным числом экспертов. Сформирован гибкий механизм, позволяющий использовать весь экспертный потенциал рынка. На сегодняшний день сформировано три рабочих группы: в первую вошли представители профессионального сообщества в области медицины, фармацевтики, разработки препаратов (они оценивают востребованность разработки на рынке, ее инновационность), во вторую – бизнес-сообщество (эксперты оценивают рыночный и коммерческий потенциал разработки, внутренние и экспортные возможности), эксперты в области интеллектуальной собственности. Часть специалистов работают «под запрос», то есть привлекаются для решения конкретных задач. С учетом сложности задачи сформирован многофункциональный состав команды: в нее вошли специалисты в области инновационных разработок, маркетинга, защиты интеллектуальных прав, эксперты в области медицины и фармацевтики», – пояснили в Министерстве промышленности и торговли Российской Федерации.

Несмотря на то, что проект стартовал только в конце сентября, интерес к нему уже проявили более 20 отечественных компаний-разработчиков: ООО «НПК «Наносистема», ФГАОУ ВПО МФТИ (ГУ), ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России», ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, ФГБУ «ННИПК им. Акад. Е.Н. Мешалкина», ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Столь пристальное внимание можно объяснить таким фактором, как отсутствие дополнительных финансовых затрат для компаний-разработчиков при обращении за помощью к специалистам проектного офиса для коммерциализации их разработок.

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

ВЫСТАВКА-ФОРУМ

ФармМедПром 2016:
демонстрация результатов реализации Государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013 – 2020 годы

Форум при участии профильных федеральных министерств и ведомств, региональных органов здравоохранения

Обсуждение результатов реализации Государственной программы и актуальных вопросов развития отрасли

Проводится в рамках 26-й международной выставки «Здравоохранение-2016»

Место проведения:
г. Москва
ЦВК «Экспоцентр»

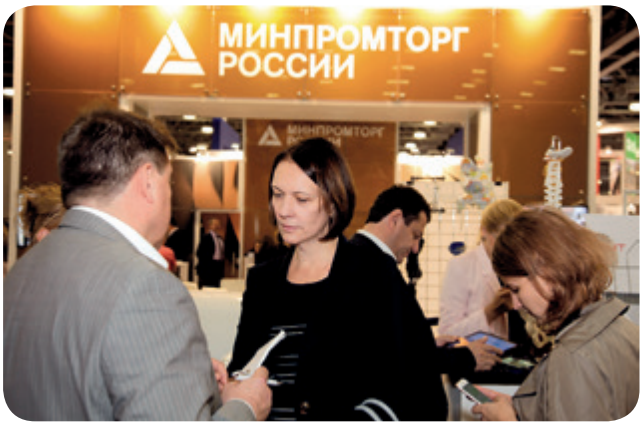
По вопросам участия обращайтесь в Центр корпоративных коммуникаций S-GROUP
+7 499 340 25 11
am@sgr.com.ru

Актуальная информация:
pharmmedexpo.ru и фарммедпром.рф

S·GROUP

II МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА «ИМПОРТОЗАМЕЩЕНИЕ»

13–15 сентября 2016 года в МВЦ «Крокус Экспо» при поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации прошла вторая выставка «Импортозамещение-2016». В рамках мероприятия Минпромторгом России была организована коллективная экспозиция предприятий фармацевтической и медицинской промышленности. На стенде министерства 37 компаний-производителей медицинской техники и лекарственных средств продемонстрировали импортозамещающую продукцию, созданную в том числе в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».



Второй год подряд столица Подмосковья представляет лучшие достижения отечественной промышленности на площадке МВЦ «Крокус Экспо». Выставка «Импортозамещение» проводится по распоряжению Правительства Российской Федерации в целях содействия выполнению задач, поставленных президентом Российской Федерации **В.В. Путиным** относительно программы импортозамещения и внедрения на национальный рынок современной инновационной конкурентоспособной продукции и услуг. Одной из самых ярких и востребованных экспозиций мероприятия стала секция, консолидирующая российских производителей фармацевтической продукции. Выступая на церемонии торжественного открытия выставки, заместитель министра промышленности и торговли Российской Федерации **Василий Сергеевич Осьмаков** подчеркнул, что необходимо не только развивать производство импортозамещающей продукции, но сделать следующий шаг – перейти к производству импортоопережающих и экспортоориентированных товаров.

Министерство промышленности и торговли Российской Федерации второй год подряд представляло коллективную экспозицию компаний-производителей лекарственных средств и медицинских изделий в соответствии с государственной программой «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности на 2013–2020 годы». Традиционно отечественные предприятия фармацевтической и медицинской промышленности продемонстрировали здесь импортозамещающую продукцию, созданную в том числе в рамках участия в федеральной целевой программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». В первый день выставки стенд министерства посетила директор департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **Ольга Николаевна Колотилова**. Участники коллективной экспозиции представили свои новинки и поблагодарили Министерство промышленности и торговли Российской Федерации за поддержку отрасли, выразив надежду на дальнейшее сотрудничество. Среди представляемых отечественных новинок в области фармацевтики гости выставки могли увидеть препарат «Ствологен» от компании «Фарма Био». Данный продукт, по словам разработчиков, – результат работы над новым методом стабилизации пептидных препаратов, которые теперь можно принимать перорально, что является существенным прорывом в применении пептидов. Компания «МФарм» в составе ведущего химико-фармацевтического холдинга России ГК «Фармконтракт» представила натуральный образец демонстрационной чистой зоны, которая применяется учреждениями здравоохранения, фармацевтическими производствами, производствами микроэлектроники и другими предприятиями, в технологическом цикле которых особое внимание отводится чистоте окружающей среды. Как отметили представители компании, неоспори-

мыми преимуществами такой чистой зоны являются следующие показатели:

- не требуются специальные помещения для использования;
- за счет компактных размеров может быть размещена практически в любом помещении;
- мобильна, имеет модульную структуру;
- по уровню чистоты воздуха практически соответствует чистым помещениям, но является значительно более дешевым решением;
- класс чистоты от A до D.

По словам вице-президента ГК «Фармконтракт», руководителя направления «Проектирование, строительство, инжиниринг, оборудование чистых помещений» **Евгения Шмакова**, в дальнейшем компания планирует увеличивать вводимые производственные участки с чистыми помещениями: «Уже сейчас производятся поставки в страны СНГ. Есть несколько поставок в страны Европейского союза. В 2017 году планируется начало *активного* экспорта продукции в страны Европейского союза. Помимо этого, в будущем году планируется строительство собственной производственной площадки для размещения производства конструкций чистых помещений, а также для производства технологического оборудования. В рамках нового производственного здания будет создан опытный участок для испытания оборудования и продуктов заказчика с целью поиска оптимального технического и технологического решения, оптимизации производственного процесса при производстве оборудования. Еще в конце 2016 года планируется запуск серийного производства центральных вентиляционных установок в исполнении для чистых помещений, учитывающих все потребности современного рынка при создании производств с чистыми помещениями. В 2017 году начатое производство указанной линейки будет только расширяться: производственный портфель дополнится технологическим оборудованием. В первую очередь речь идёт о маркировочном оборудовании, линиях фасовки твердых лекарственных форм, а также изоляторах для производственных линий». Производство отечественного технологического оборудования для фармацевтической промышленности является принципиально важной задачей для реализации намеченной стратегии в рамках программы «Фарма-2020» как в части производства готовых лекарственных средств, так и в части производства активных фармацевтических субстанций.

Участники стенда коллективной экспозиции Министерства промышленности и торговли Российской Федерации на выставке «Импортозамещение-2016» высоко оценили важность проведения таких мероприятий, в частности генеральный директор ООО «Натива» **Александр Александрович Малин** подчеркнул: «Международная выставка «Импортозамещение-2016» является отличной площадкой для освещения и демонстрации отечественных достижений в различных отраслях промышленности, в том числе и в фармацевтике. Отечественный фармацевтический рынок является одним из самых быстрорастущих и нацелен на решение важной и амбициозной задачи – создания в России конкурентоспособных производств. И надо сказать, что уже сегодня отечественные фармацевтические компании обгоняют западные по скорости освоения и завоевания внутреннего рынка». В первый день выставки на стенде Минпромторга России отечественная фармацевтическая компания «Натива» и ведущий бразильский производитель медицинского оборудования и сложных технологических решений Emphasys Industrial подписали соглашение о долгосрочном сотрудничестве в области разработки средств для порошкового ингалирования на сумму более 1,5 млн евро.

Помимо обширной выставочной экспозиции, представляющей достижения лучших отечественных производителей, Минпромторг России принял активное участие и в деловой программе мероприятия. Так, выступая на пленарном заседании, заместитель министра промышленности и торговли Российской Федерации **Василий Сергеевич Осьмаков** в качестве одного из инструментов стимулирования создания импортозамещающей продукции отметил успешные результаты внедрения протекционистской политики, в том числе в отрасли фармацевтической и медицинской промышленности.

Во второй день выставки под эгидой министерства прошла конференция *«Актуальные вопросы разработки и производства импортозамещающей продукции в фармацевтической и медицинской промышленности»*, работу которой открыл заместитель директора департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **Алексей Викторович Алехин**. Он отметил важность организации отдельного тематического мероприятия, посвященного вопросам импортозамещения в фармацевтической и медицинской промышленности, в том числе с целью получения обратной связи от производителей: «Для нас, как одного из регуляторов, важно понимать мнение отрасли, как оно формируется, какие тенденции и какие пожелания у вас есть». После окончания дискуссии участники перешли к обсуждению реализации совместных проектов и выразили надежду на продолжение диалога, в том числе и на мероприятиях Минпромторга России. В частности, генеральный директор ЗАО «ФПК «ФармВИЛАР» **Инна Васильевна Воскобойникова** отметила: «Выставка очень полезная. Мы благодарны Минпромторгу России за приглашение принять участие в составе коллективной экспозиции и выступить с докладом «Опыт компании «ФармВИЛАР» по импортозамещению в рамках контрактного производства». В ходе выставки удалось пообщаться с коллегами по фармацевтическому рынку, обсудить важные вопросы, касающиеся выпуска импортозамещающей фармацевтической продукции. Данная выставка позволит нам расширить круг партнеров по контрактному производству. Такие мероприятия необходимы специалистам для обмена мнениями».

IV ЕЖЕГОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В РОССИИ И ЗА РУБЕЖОМ»

14 сентября 2016 года компания «ОСТ» собрала специалистов фармацевтической отрасли и представителей органов власти на первом осеннем мероприятии, посвященном клиническим исследованиям. Узкоотраслевая конференция компании «ОСТ» проводится с 2012 года и пользуется высокой популярностью, поскольку организаторам удается сочетать необходимый баланс общих тем в области полного цикла производства лекарственных средств и специфики клинических исследований. Значительный уровень популярности формирует и статус спикеров: высокая доля руководителей департаментов профильных органов государственной власти – Минпромторга, Росздравнадзора, Минздрава, ФАС России, ФГБУ «НЦЭСМП», ЕАЭС, ФГБУ «ЦМИКЭЭ». В этом году конференция собрала около 300 специалистов биотехнологической отрасли.

В ходе четырех панельных дискуссий участники конференции **«Клинические исследования в России и за рубежом»** обсудили текущее состояние и перспективы развития клинических исследований в рамках ЕАЭС и с учетом новой редакции ICH GCP, уделили внимание тенденциям развития российских фармацевтических проектов на международной арене, разобрав сложности выхода российских проектов на внешний рынок на базе громкого проекта по онкодиагностике холдинга «Атлас» и взаимодействия фармацевтических компаний и инвесторов с биотехнологическими стартапами, а также обсудили вопросы планирования и начала исследований в отношении обработки клинических данных и факторы, влияющие на них.

Исполняющий обязанности директора центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» **Дмитрий Горячев** отметил, что на текущем этапе развития России представители фармацевтической отрасли единогласно признают значимость клинических исследований: «Это се-

рьезная, ответственная и необходимая деятельность. Одна из задач для участников фармотрасли – прийти к единому понимаю механизма работы всех направлений клинических исследований: от законодательных аспектов до планирования и решений в области дизайна клинических исследований, биостатистики и других составляющих». Именно поэтому спикер подробно остановился на разборе термина «терапевтическая эквивалентность» и элементах биостатистики. Согласно ФЗ № 61 от 12.04.2010 «Об обращении лекарственных средств» под терапевтической эквивалентностью понимается достижение клинически сопоставимого терапевтического эффекта при применении лекарственных препаратов для одной и той же группы больных по одним и тем же показаниям. Воспроизведенным лекарственным препаратом при этом является «лекарственный препарат, который имеет такой же качественный и количественный состав действующих веществ в такой же лекарственной форме, что и референтный лекарственный препарат, и биоэквивалентность или терапевтическая эквивалентность которого референтному лекарственному препарату подтверждена соответствующими исследованиями». Закон также дает определение «соответствующего исследования» терапевтической эквивалентности: «Исследование терапевтической эквивалентности лекарственных препаратов – вид клинического исследования лекарственных препаратов, проведение которого осуществляется для выявления одинаковых свойств лекарственных препаратов определенной лекарственной формы, а также наличия одинаковых показателей безопасности и эффективности лекарственных препаратов, *одинаковых* клинических эффектов при их применении». Таким образом, терапевтическая эквивалентность проводится для определенных лекарственных форм с целью выявления одинаковых свойств лекарственных препаратов, одинаковых показателей безопасности и эффективности и одинаковых клинических эффектов. В то же время, как отметил **Дмитрий Горячев**, в законе отсутствует четкая регламентация проведения терапевтической эквивалентности: «Нет указания на единственно возможный дизайн. Не декларируется обязательное прямое сравнение с референтным препаратом в рамках одного исследования! То есть законом не дано широкое толкование термина, не требующее соответствия биостатистическому определению термина эквивалентности», – резюмировал спикер. Таким образом, при планировании клинических исследований для подтверждения «терапевтической эквивалентности» необходимо ответить на следующие вопросы:

- Обоснованно ли во всех случаях проводить исследование, по дизайну соответствующее исследованию эквивалентности в прямом сравнении с референтным препаратом?
- Насколько обоснованы границы эквивалентности?

Заместитель начальника департамента технического регулирования и аккредитации ЕЭК **Дмитрий Рождественский** рассказал участникам конференции о требованиях, которые предъявляются к клиническим исследованиям как части регистрационного досье лекарственного препарата в ЕАЭС. При этом спикер отметил, что представленные в досье клинические исследования рассматриваются в процессе экспертизы при соблюдении *одного* из следующих условий:

- клинические исследования проведены до 01.01.2016 г. или продолжаются по состоянию на эту дату (набор пациентов не закрыт) на территории ЕАЭС;
- клинические исследования проведены до 01.01.2016 г. на территории государств-членов ICH (государств, на территории которых требования к регистрации лекарственных средств регулируются уполномоченным органом, ставшим учредителем или постоянным членом Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения) и зарегистрированы по результатам клинических исследований в этих государствах;

- клинические исследования, инициированные после 01.01.2016 г., должны проводиться полностью или частично (как минимум одно) на территории ЕАЭС.

В том случае, когда перечисленные условия не выполняются, заявитель обязан провести (как минимум одно) клиническое исследование на территории ЕАЭС или по решению уполномоченного органа провести инспекцию клинической базы.

Директор по клиническим операциям компании «ОСТ» **Ирина Петрова** познакомила участников конференции с проектом новой редакции ICH GCP. Поправки к руководству E6 обусловлены эволюцией клинических исследований с 1996 г. и предполагают смещение фокуса с менее важных аспектов на критичные: «Вместо полной верификации всей первичной информации фокус на риски, влияющие на целостность и валидность ключевых данных». Сами поправки сводятся к тому, что в глосарии возникают новые термины, уточняется принцип 2.1, а также в обязанности исследователя включаются супервизия делегированных задач, обеспечение целостности данных и требования к первичной документации. Как отметила спикер, поправки касаются и ряда обязанностей спонсора клинического исследования.

- Управление качеством.
- Применение подхода risk-based:
  - идентификация критичных процессов и данных;
  - идентификация, оценка, контроль, сообщение, проверка и репортирование рисков.
- Супервизия.
- Использование компьютерных систем.
- Отслеживание случаев несоблюдения процедур, регуляторных требований и протокола.
- Мониторинг:
  - комбинация централизованного и on-site мониторинга;
  - обоснование выбранной стратегии;
  - разработка плана мониторинга.

Говоря о развитии российских фармацевтических проектов на международной арене, **Владислав Милейко** из «Атлас Онкодиагностика» поделился опытом компании по преодолению конкуренции на внешнем рынке за счет позиционирования в стандартах клинической онкологии молекулярной диагностики экспертного класса. Представитель «Сколково» **Руслан Алтаев** рассказал об успешных этапах развития экосистемы «Сколково» и инструментах поддержки ее участников в международных проектах. **Алексей Гиенко** из «ФРИИ» поделился своим опытом в области решения проблем при выводе российских проектов на зарубежные рынки. Среди типичных проблем, с которыми в той или иной степени сталкивается любой отечественный проект, спикер выделил отсутствие четкого понимания цен на необходимые услуги и сервисы в различных странах и географиях, отсутствие учета местных цен при построении бюджета на экспансию (или неправильное планирование Cash flow), неверные ценностные предложения, сложности с наймом персонала и незнание местного законодательства. **Елена Адамова** из «Фармстандарта» представила успешный опыт международного сотрудничества российского производителя лекарственных препаратов и иностранных фармкомпаний. В основе успеха спикер видит базовые критерии, которым должен соответствовать любой проект: завершен в установленные сроки, в рамках выделенного бюджета и результат удовлетворяет заказчика. **Иван Бурков** из Sanofi, рассказывая об успешных проектах компании, заметил, что успех складывается из внутренней экспертизы и внешних связей.

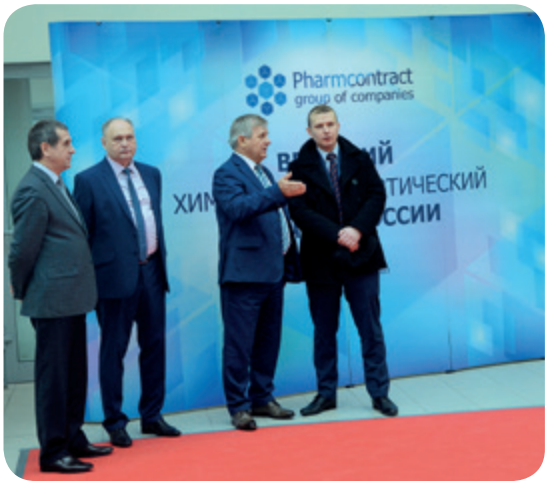
Вопросам рандомизации пациентов (случайному характеру процесса распределения испытуемых в основную и контрольную группы), особенности работы биостатистика на этапе запуска исследования, ответственности заказчика, в роли которого может выступать фармацевтическая компания или КИО, были посвящены доклады представителей Data Matrix.

Завершилась **IV ежегодная конференция «Клинические исследования в России и за рубежом»** дискуссией о медицинских изделиях, в ходе которой участники обсудили критерии отнесения изделий к медицинским и принципы определения состава медицинского изделия.

Подводя итоги конференции, президент компании «ОСТ» **Дмитрий Шаров** поблагодарил спикеров и гостей мероприятия и отметил: «Мы очень рады, что в этом году нам удалось тематически серьезно расширить конференцию и привлечь много отраслевых экспертов. Для нас данная ежегодная встреча – это не только возможность поделиться актуальной информацией с коллегами и внести свой вклад в развитие отрасли. В первую очередь это дискуссионная площадка и шанс для активных участников индустрии вместе обсудить важные темы».

19-Я МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА ХИМИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И НАУКИ «ХИМИЯ-2016»

19–22 сентября 2016 года в Москве на территории ЦВК «Экспоцентр» прошла ежегодная осенняя выставка для специалистов химической промышленности. В этом году, как отметили участники и гости выставки, мероприятие проходило значительно скромнее, чем обычно. В то же время традиционные спонсоры и партнеры вновь порадовали гостей новинками в области высокотехнологичного оборудования и химических продуктов. Постоянным информационным партнером мероприятия выступил научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств», представил гостям выставки новые периодические издания и востребованные специалистами фармацевтической и химической промышленности отраслевые монографии.



Приветствуя гостей выставки на торжественной церемонии открытия, заместитель министра промышленности и торговли Российской Федерации Сергей Цыб зачитал послание министра **Дениса Мантурова**, в котором отмечен большой потенциал химического комплекса и стабильный рост производства в этом секторе: «Несмотря на сложные экономические условия, химический комплекс показывает положительную динамику развития, реализуются крупные инвестиционные проекты, расширяется ассортимент востребованной продукции по целому ряду инновационных малотоннажных и среднетоннажных продуктов». Более того, в сопоставлении данных промышленного производства в химическом комплексе за первое полугодие 2015 и 2016 годов прослеживается рост в 5,3%. Одной из самых актуальных тем **Сергей Цыб** считает развитие малотоннажной химии. С ним солидарен и коллега из министерства энергетики **Кирилл Молодцов**: «Наша задача – малотоннажное и среднетоннажное производство, которые дадут новый импульс развитию кооперации государства и частного бизнеса, что позволит создавать новые рабочие места».

Знакомясь совместно с представителями органов власти с выставочной экспозицией, гости «Химии-2016» могли не только увидеть достижения отечественных производителей в области производства химических продуктов, но и познакомиться с новинками оборудования для химического синтеза как в условиях пилотного производства, так и в промышленных масштабах. В частности, на стенде постоянного партнера выставки ведущего химико-фармацевтического холдинга России **ГК «Фармконтракт»** впервые были представлены 2-литровый лабораторный реактор **Schmizo**, нагревающий термостат **ICS Cool Energy i-Temp TT 60** с температурным диапазоном +40…+300 °C, мощностью нагрева 9 кВт и мощностью охлаждения 82 кВт при +200 °C, а также оборудование новых партнеров холдинга: титраторы **Metrohm**, вибровискозиметр **A&D SV-100**, дезинфекционно-моечный автомат **Miele** и многое другое. Как отметил президент холдинга **Сер-**

гей Быковский в интервью для официальной газеты выставки «Химия-2016», в прошлом году, несмотря на довольно непростые экономические и геополитические условия, ввод секторальных санкций, холдинг стабильно привлекал новых зарубежных поставщиков оборудования: производителя автоматических анализаторов **Skalar** (Голландия), а также крупнейший мировой холдинг, представляющий оборудование для биотехнологической и фармацевтической промышленности **GE** (США), производителя автоматизированных систем для геномики, протеомики, клеточного анализа **Beckman Coulter** (США) и американского производителя **Danaher**. «2016 год стал годом серьезного роста нашего продуктового портфеля – **ГК «Фармконтракт»** стала официальным представителем ведущего корейского производителя оборудования для твердых лекарственных форм **Sejong Pharmatech**, высокотехнологичного лабораторного оборудования **CRYSTE**; мы расширили линейку представляемых систем гомогенизации и френч-прессов для работы с млекопитающими, микробами, клетками насекомых и растительными веществами; высококачественных колонок ВЭЖХ, сорбентов для хроматографии, квечерсов, установок и картриджей для твердофазной экстракции (SPE), лайнеров для газовой хроматографии», – подчеркнул **Сергей Быковский**. Некоторые единицы оборудования новых производителей были представлены на стенде ГК «Фармконтракт» в рамках выставочной экспозиции.

«Каждый год, готовя выставочную экспозицию, мы стараемся учесть потребности рынка, – отметила вице-президент по коммерции и маркетингу ГК «Фармконтракт» **Оксана Якименко**. – В этом году представители химической промышленности интересовались процессом масштабирования производства. Именно поэтому мы представили не просто отдельные единицы лабораторных реакторов, позволяющих проводить растворение, смешение, экстракцию и химический синтез при диапазоне температур –30…+200 °С и давлении –1…+0,3 бар. Представленный 2-литровый лабораторный реактор **Schmizo** швейцарского производства включает в себя напольный штатив из нержавеющей стали AISI 304, цилиндрический сосуд с эллиптическим днищем, рубашкой для нагрева/охлаждения и вентилем донного слива (ПТФЭ, Ду-16) без мертвого объема, крышку с набором стандартных конических шлифов ISO NS (45/40; 29/32x3; 14/23), термосопротивление Pt100 (4-проводное с разъемом LEMO), обжимное уплотнение вала типа FLUKA, вал мешалки из нержавеющей стали с ПТФЭ покрыием и 2-х уровневыми лопастными перемешивающими элементами из ПТФЭ, высокооборотистую верхнеприводную мешалку **IKA** и циркуляционный термостат **Julabo** с рабочим диапазоном температур –25…+150 °С. Наши технологи представляли готовые решения «под ключ», позволяющие перевести производство на промышленный уровень». Об этом специалисты холдинга рассказывали 20 сентября в рамках специализированного семинара/мастер-класса *«Химический синтез: от лаборатории до пилотного производства»*, уделяя особое внимание оперативному решению проблем, с которыми сталкивается любой разработчик, выводя продукт на этап серийного производства.

Специализированный семинар/мастер-класс проходил в рамках второго дня работы 19-й международной выставки химической промышленности и науки «Химия-2016». Здесь инженеры-технологи холдинга поделились опытом проектирования лабораторных и пилотных производственных линий для химических и фармацевтических предприятий, представили уникальные решения для гетерофазного катализа и газофазных процессов, лабораторного контроля качества сырья и готовой продукции.

Мероприятие вызвало живой интерес гостей «Химии-2016». В процессе доклада по оптимизации выбора оборудования для химического синтеза при производстве АФИ завязалась дискуссия с химиками-технологами фармацевтических компаний. Ключевым дискуссионным вопросом стало соответствие производственной линии требованиям GMP. Как отметил инженер-технолог ГК «Фармконтракт» **Дмитрий Ткач**, в линейке официального дистрибьютора мировых производителей оборудования,

работающих в условиях GMP практически полвека, представлен самый обширный спектр приборов, позволяющих создать как R&D-участок, так и крупную производственную линию. Опыт партнеров, работающих в условиях GMP практически с даты их введения, позволяет еще на этапе получения технического задания от заказчика определить параметры процесса (T, P, PH …), коррозионную активность, взрывобезопасность, объёмы, материал реактора, измеряемые параметры и краткое описание процесса. На основе имеющихся параметров на этапе согласования технологической схемы осуществляется выбор и подбор оптимального оборудования. При этом, учитывая нормы GMP, пристальное внимание технологи уделяют дизайну, размеру и местоположению высокотехнологичного оборудования, особенностям конструкций (инертности и герметизации), очистки и техническому обслуживанию, которое будет необходимо проводить в процессе использования выбранного оборудования. Не обходят стороной и вопросы автоматизации процесса с помощью соответствующих приборов, проводя осмотр и калибровку, авторизацию и независимый контроль. Только учтя все перечисленные параметры, инженеры-технологи предлагают оптимальные альтернативы, уточняя у производителя габариты, прорабатывая соединения и вопросы сертификации. В результате к моменту подготовки и подписания контракта заказчик имеет проработанное решение, удовлетворяющее требованиям GMP. А значит, в случае изменения производственной мощности АФИ действие по принципу «приобрести оборудование большей мощности того же производителя» не даст гарантии успешного прохождения инспектората. Более того, производитель АФИ столкнется с проблемой отсутствия в линейке некоторых производителей оборудования единиц, позволяющих, например, проводить измельчение большего количества продуктов: универсальный привод **ERWEKA AR 403** рассчитан на 20 кг/ч, в то время как мельницы FPS позволяют измельчать до 80 кг продукта за это же время! Та же ситуация и с получением химического вещества путем экстракции: экстракторы **BUCHI Labortechnik** превосходно справляются со 100 г образца, а вот для партии в 10 кг потребуются системы **BuchiGlasUster**.

По традиции, как и на любом отраслевом семинаре, организуемом ГК «Фармконтракт», участникам представили свои новинки партнеры холдинга. Так, представители **BUCHI Labortechnik** рассказали о преимуществах новой системы для препаративной хроматографии Reveleris®. Препаративная хроматография с момента своего создания приобрела ряд преимуществ: она позволяет обнаружить все компоненты смеси, провести их быстрое разделение с высокой степенью чистоты образца и его минимальными потерями. Автоматическая высокопроизводительная хроматографическая система со встроенным ELSD (детектором по светорассеянию) **Reveleris Prep** от **BUCHI Labortechnik** в отличие от своих предшественников сочетает в себе флэш- и препаративный режим, позволяет работать с 4 растворителями и имеет двойной градиент до 200 мл/мин, 120 бар (1700 psi), интегрированные UV-Vis & ELSD. При этом ELSD требует менее 30 мкл/мин.

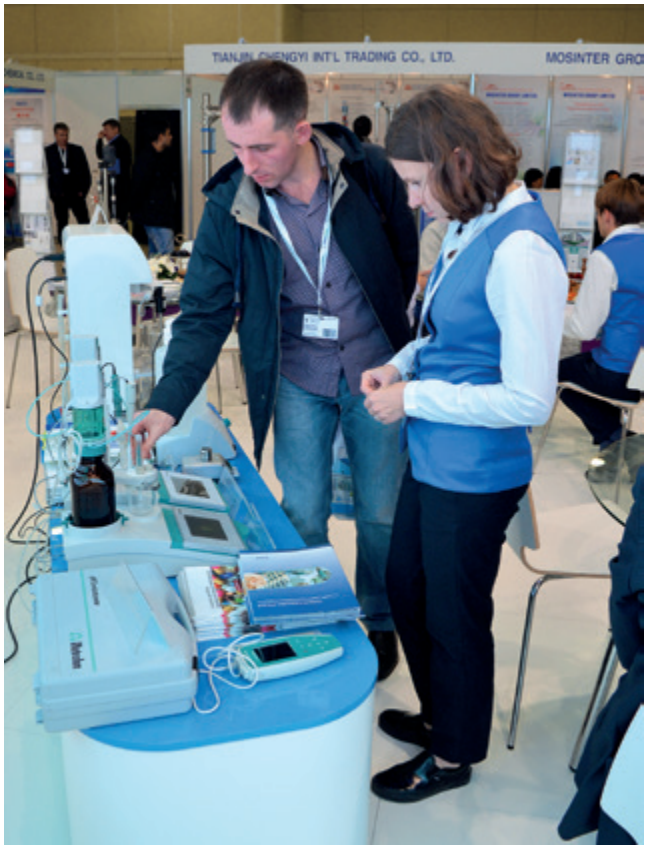
Представляя современные решения для гетерофазного катализа и газофазных процессов, главный технолог ГК «Фармконтракт» **Олег Новожилов** подробно рассказал о процессах гидрирования, карбонилирования, полимеризации, гидрокрекинга, окисления кислородом и озонолиза, используемых в нефтехимическом синтезе, синтезе полимеров, при получения комбинированных жиров, в пищевой промышленности, фармацевтической химии, металлургии и органическом синтезе. Докладчик представил детальное сравнение линейки стандартных проточных реакторов для гидрирования Thales Nano H-cube, иллюстрируя проведение процессов в проточном режиме. При проведении процессов в периодическом режиме спикер рекомендует выбирать реактор для работы под давлением **BuchiGlasUster Polyclave**, корзины для размещения твёрдого катализатора и систему дозирования газов. Особое внимание **Олег Новожилов** уделил многообразию лабораторных авто-

клавов **BuchiGlasUster**, сравнивая их возможность автоклавов этого же производителя для пилотных участков, пригласив участников семинара ознакомиться с демонстрационной моделью реактора-автоклава для изучения процессов полимеризации, представленном на стенде ГК «Фармконтракт».

Еще одной новинкой семинара стало выступление о лабораторном контроле качества сырья и готовой продукции с помощью титраторов **Metrohm**, официальным дистрибьютором которого стала ГК «Фармконтракт». Как известно, титрование применяется с XVIII века. В те времена процесс титрования происходил вручную: визуальное определение, контроль и добавление вручную. Сегодня титрование осуществляется с помощью соответствующих приборов, ряд из которых гости выставки «Химии-2016» могли увидеть на стенде ГК «Фармконтракт»: **Food 916 Ti-Touch** для титрования до конечной точки и установления pH, **915 KF Ti-Touch** для волюметрического титрования и определения содержания воды в образце по методу Карла Фишера, а также **913 pH Meter** для одновременного измерения двух значений pH. При выборе того или иного титратора прежде всего стоит определиться с режимом титрования. Так, титрование до конечной точки Set Endpoint Titration, SET проводится, когда известна конечная точка; монотонное титрование Monotonic Equivalence point Titration, MET подходит для медленных реакций: это не водное титрование, кривая при нем не имеет S-образного вида; динамическое титрование Dynamic Equivalence point Titration, DET используется для быстрых реакций, когда крайне важно время, затраченное на исследование; титрование по Карлу-Фишеру Karl Fischer Titration, KFT задействуется для определения воды. Исходя из этого, рекомендуется делать выбор в пользу конкретного титратора из широкой линейки компании **Metrohm**, которая является признанным лидером в области титрования.

Завершился семинар обзором применения анализаторов **Skalar** для определения нормативных показателей содержания углерода и азота.

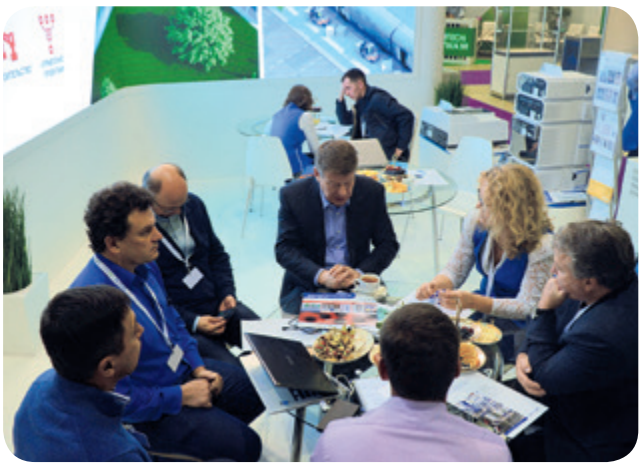
Особый интерес специалисты химической промышленности проявили к представленному в рамках выставочной экспозиции сосуду для смешивания **mixing vessel**. Данный прибор представляет собой мобильный сосуд, установленный на передвижной тележке, оснащенный всеми необходимыми агрегатами для создания, поддержания и контроля давления (до 1,5 АТИ) и температуры, а также перемешивания обрабатываемых составов. Передвижной смеситель CR со стеклянной рубашкой и контролем режимов нагрева, охлаждения и перемешивания позволяет предприятиям (лабораториям) фармацевтической, химической и пищевой промышленности проводить химические процессы в контролируемых условиях в чистых объ-



емах стеклянных реакторов: растворение веществ, очистку композиций, экстракцию, перекристаллизацию и ряд других. Благодаря технологии очистки и промывки CIP санитарно-гигиеническая обработка проводится без демонтажа и разборки системы на части: сосуды для перемешивания и все элементы связанной с ними арматуры остаются в собранном виде. Это делает **mixing vessel** чрезвычайно удобным устройством для решения задач, стоящих перед небольшими лабораториями и производственными линиями.

Вторым по популярности прибором стал автоклав **BuchiGlasUster Policlave**, используемый для проведения опытов и процессов химического синтеза под избыточным давлением 6, 10 и 60 бар в диапазоне высокотемпературных условий 200–250 °С.

Не меньшей популярностью пользовался и вибровискозиметр **A&D SV-100**. Как отметили представители ГК «Фармконтракт», большинство гостей выставки интересовалось, а что же это такое и для чего необходим прибор. Вибровискозиметр – вискозиметр (прибор для определения вязкости вещества), принцип действия которого базируется на определении изменения параметров колебаний погруженного в



жидкость тела правильной геометрической формы. Данный прибор применяется для непрерывного и высокоточного измерения вязкости жидкости, содержащей пузырьки, а также взвесей и текучего образца. При этом минимальный размер образца может составлять 35 мл! Отличительная особенность вибровискозиметра **A&D SV-100** – широкий диапазон измерений без замены сенсорных пластин, который достигает 100 Па·с.

Традиционно на самом красочном стенде, привлекающем внимание всех посетителей, был представлен широкий выбор оборудования, востребованного любой химической лабораторией: от сушильного шкафа **BINDER ED 23** с механическим регулированием, позволяющего выполнять стандартные работы по сушке и стерилизации при температуре до 300 °С, до фильтров и мембран **Whatman**, представляющих собой высококачественное оборудование, применяемое в различных отраслях промышленности для проведения повседневной пробоподготовки, исследования однородности содержимого продукта, анализа на концентрацию. Для специалистов фармацевтической отрасли демонстрировался автоматический тестер распадаемости **ERWEKA ZT722** с двумя индивидуальными тестовыми станциями, оснащенными интегрированным проточным нагревателем водяной бани. Прибор соответствует статьям USP, EP и ГФ XIII изд. Температурный датчик прибора позволяет постоянно контролировать температуру водяной бани. В рамках обширной экспозиции «решения «под ключ» гости выставки «Химия-2016» могли увидеть знакомые и используемые на ряде объектов российской промышленности ВЭЖХ-системы **Agilent Technologies 1260 Infinity II LC**, позволяющие осуществлять ввод пробы под давлением до 600 бар с уровнем флуктуационных шумов базовой линии на длине волны 230 нм – не более $\pm 0{,}9 \cdot 10^{-5}$ Б. Представленный ИК-фурье-спектрометр **Agilent Cary 630** зарекомендовал себя благодаря решению разноплановых задач, легкостью анализа любых газообразных, жидких и твердых образцов проб. Помимо этого, гости одного из самых главных в году событий химической промышленности могли еще раз рассмотреть и уточнить особенности проведения поточных производственных анализов с помощью УФ-Вид-спектрометра **Agilent Cary 100**.

Традиционно в рамках выставочной экспозиции были представлены дистиллятор **BUCHI AG**, распылительная сушилка **BUCHI AG B-290** для водных и органических растворов, система экстракции **E812SOX** по Сокслету, БИК-фурье-спектрометр **NIRFlex N500**, позволяющий анализировать порядка 100 образцов в сутки.

Подводя итоги выставки, представители спонсора мероприятия отметили высокую популярность «Химии-2016» среди высококвалифицированных специалистов своего дела.

ЧЕТВЕРТЫЙ ПАРТНЕРИНГ «ЛЕКАРСТВА РОССИИ – К МЕЖДИСЦИПЛИНАРНОМУ ДИАЛОГУ»

22 сентября 2016 года ФАС России, Министерство здравоохранения Республики Татарстан и Ассоциация российских фармацевтических производителей собрали на одной площадке представителей регуляторных органов, производителей лекарственных средств и экспертов фармацевтического рынка для обсуждения вопросов совершенствования системы лекарственного обеспечения населения. Традиционно партнеринг прошел в формате открытого и продуктивного диалога представителей бизнес-сообщества и органов государственной власти. Мероприятие прошло при поддержке научно-производственного рецензируемого журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств».

В середине сентября на площадке учебно-методического центра ФАС России в Казани собрались представители Государственной Думы РФ, Генеральной прокуратуры РФ, МВД РФ, Министерства здравоохранения, Министерства экономического развития, ФАС России, Росздравнадзора, Минздрава Татарстана, ТПП Татарстана, предприятий-производителей, оптовиков, аналитических и юридических компаний, которые обсудили важнейшие вопросы, волнующие весь фармацевтический рынок страны: правоприменение постановления о «третьем лишнем», закупки у единственного поставщика, специнвестконтракты, критерии локального продукта, выдачу сертификатов СТ-1 и др. Вопросы совершенствования системы лекарственного обеспечения населения России, повышения доступности лекарств для различных категорий граждан становятся все более актуальными. Благодаря совместным усилиям власти и бизнеса удалось добиться значимых результатов, однако существуют и проблемные точки, которые и стали ключевыми темами организованной ФАС России и АРФП конференции, посвященной взаимодействию бизнеса и государства при балансе интересов в системе лекарственного обеспечения граждан.

Партнеринг «Лекарства России – к междисциплинарному диалогу» ежегодно привлекает более трехсот участников, получает поддержку федеральных и региональных госструктур.

«Традиционно партнеринг собирает представителей органов государственной власти, бизнеса, медицинского сообщества, ведущих специалистов фармацевтической отрасли. Подобное продуктивное взаимодействие сегодня, как никогда, востребовано. Перед нами стоят общие серьезные задачи, требующие взвешенного и профессионального подхода: развитие отечественной фармацевтической промышленности, реализация государственной программы по импортозамещению, обеспечение россиян качественными и эффективными препаратами. В решении данных вопросов необходимо найти справедливый баланс между интересами пациентов и экономическими интересами отечественной фармацевтической и медицинской промышленности. Программа партнеринга позволит участникам мероприятия получить ответы на интересующие вопросы и в конечном итоге найти оптимальное решение для поставленных государством задач», – отметил руководитель Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения **Михаил Мурашко**.

Высокую роль мероприятия отметила и заместитель министра здравоохранения Республики Татарстан **Фарида Яркаева**: «Интересен его формат, позволяющий рассматривать проблемные точки функционирования отрасли на примере практических кейсов, с привлечением к диалогу не только представителей отрасли, но и Генпрокуратуры России, Федеральной антимонопольной службы, региональных комитетов по закупкам и других представителей федеральных и региональных органов власти. Судя по поступающим заявкам, участников становится больше, расширяется география партнеринга. Это связано и с последними изменениями: утверждается большое количество новых законов, нормативно-правовых актов, правоприменительная практика не всегда за этим успевает».

«Регуляторы, представители фармбизнеса и потребители в лице госструктур, осуществляющих закупку лекарств на бюджетные средства, имеют довольно ограниченное количество возможностей для открытого и честного обмена мнениями о состоянии отрасли. При этом стороны крайне заинтересованы в диалоге с целью консолидации усилий по совершенствованию работы системы лекарственного обеспечения России, развития фармацевтической промышленности, отрасли охраны здоровья в целом. Именно поэтому формат партнеринга «Лекарства России – к междисциплинарному диалогу», который проходит уже четвертый год, уникален. Мероприятие поощряет участников открыто озвучивать свою позицию не только в кулуарах, но и с трибуны. Партнеринг – место для дискуссий. Такая площадка «неотфильтрованного» обмена мнениями позволяет формулировать актуальную повестку отрасли, обращать внимание на проблемы и возможности, находить решения и вводить в правовое поле наиболее востребованные из озвученных на форуме инициатив», – такую оценку мероприятию дал спонсор партнеринга – руководитель отдела государственных программ и ценообразования ООО «Новартис Фарма» **Кирилл Левашов**.

Стоит отметить, что организаторы мероприятия постоянно работают не только над расширением аудитории партнеринга, но и стремятся внедрить новые механизмы, способствующие повышению его эффективности. Так, еще до начала мероприятия АРФП внедрило механизм обратной связи для участников партнеринга: каждый мог заранее оставить свой вопрос, рассказать о проблемных точках, предложить свое видение тех или иных вопросов из повестки партнеринга. Одним из ключевых вопросов, волнующих всех участников фармацевтического рынка, стала тема выдачи сертификатов СТ-1. Практика показывает, что порядок выдачи СТ-1 разнится от региона к региону, поэтому крайне важно учитывать опыт коллег, своевременно реагировать на предложения представителей региональных ТПП и производителей лекарственных средств.

Открывая первую сессию «Совершенствование системы лекарственного обеспечения населения России. Взаимодействие бизнеса и государства при балансе интересов», начальник управления контроля социальной сферы и торговли ФАС России **Тимофей Нижегородцев** рассказал, что в настоящее время в

Тимофей Нижегородцев

Правительстве Российской Федерации проходит обсуждение проекта дорожной карты по лекарственному обеспечению населения. При этом ФАС России уже представил ряд предложений по совершенствованию системы лекарственного обеспечения. Среди них необходимость установления взаимозаменяемости как «единственный способ снижения цен на лекарства». В этой ситуации, по словам спикера, целесообразно опираться на опыт стран ЕАЭС, где участники фармацевтического рынка сами составляют реестр взаимозаменяемых лекарственных средств. Помимо этого, ФАС России предлагает изменить сам принцип работы по составлению перечня ЖНВЛП: «Комиссия должна работать постоянно, рассматривая не больше 5 препаратов за одно заседание, таким образом более подробно обсуждая каждый пункт перечня. Кроме того, в состав комиссии обязательно должны быть включены производители, пока же процесс остается достаточно закрытым».

Тимофей Витальевич в своем докладе затронул и вопросы ценообразования: «Несмотря на то, что цены на большинство препаратов в России ниже, чем в референтных странах, есть исключения: таким производителям ФАС предлагает воспользоваться возможностью перерегистрации цены».

Министр здравоохранения Республики Татарстан **Адель Вафин** акцентировал внимание участников партнеринга на повышении доли отечественных препаратов в госзакупках: «Это стратегическая задача государства, которую совместными усилиями производителей и представителей власти удается успешно реализовывать: если в 2014 году произведенные в России препараты составляли 33% от общего объема лекарств, закупаемых по ФЗ-44, то в 2016 году их доля выросла до 72%». Тему госзакупок продолжила заместитель начальника Управления по борьбе с картелями ФАС России **Ольга Франскевич**, приводя данные о выявленных в 2015 году нарушениях: «За прошедший год признаки картелей

Адель Вафин

были выявлены при проведении более 3000 открытых аукционов, нарушения на торгах выявлены в 80 регионах страны».

Наибольший интерес участников партнеринга вызвала тема выдачи и применения сертификата о стране происхождения товара СТ-1 в рамках постановления Правительства Российской Федерации № 1289 от 30 ноября 2015 г. «Об ограничениях и условиях допуска происходящих из иностранных государств лекарственных препаратов, включенных в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, для целей осуществления закупок для обеспечения государственных и муниципальных нужд» (так называемое постановление о «третьем лишнем»). Генеральный директор АРФП **Виктор Дмитриев** отметил, что недавно в постановления, регулирующие процедуру выдачи сертификатов, были внесены долгожданные изменения, которые позволили упростить и ускорить ее. Участники партнеринга получили разъяснения о сроках действия сертификата, его верификации, условиях применения, порядке проведения инспекции и выдачи заключения от начальника отдела методического обеспечения проведения сертификации и экспертной деятельности ТПП РФ **Сергея Родионова** и заведующего отделом правового сопровождения внешнеэкономической деятельности ТПП РФ **Анатолия Маянцева**. В частности, производителей волновал вопрос о сроках действия сертификатов, выданных на препараты, в отношении которых на территории Российской Федерации осуществляется только упаковка. Спикеры отметили: «Сертификат будет выдаваться на препараты, в отношении которых на территории Российской Федерации осуществляется только упаковка, только до конца 2016 года».

Анатолий Александрович рассказал и о таких новеллах, связанных с получением СТ-1, как возможность получения организацией, осуществляющей закупки, копии сертификата СТ-1 в ближайшей региональной ТПП, если она не имеет возможности получить такой сертификат от производителя. Более то-

Виктор Дмитриев

го, теперь достоверность конкретного сертификата можно проверить на электронном верификационном ресурсе ТПП. Однако доступом к этому ресурсу пока еще обладают не все, на что и обратил внимание **Виктор Дмитриев**, обращаясь к ТПП с предложением сделать перечень всех выданных сертификатов общедоступным. «В таком случае при подаче заявки на участие в торгах производители смогут давать ссылку на реестр вместо сертификата», – резюмировал руководитель АРФП.

Подводя итоги прошедшего в Казани четвертого партнеринга **«Лекарства России – к междисциплинарному диалогу»**, генеральный директор АРФП **Виктор Дмитриев** отметил: «Любой документ мы воспринимаем как живой организм, в который можно и нужно вносить изменения. Все возникшие сегодня вопросы будут сформулированы и направлены в соответствующие федеральные органы исполнительной власти. Мы уверены, что сегодняшняя продуктивная встреча не последняя, и через год мы снова встретимся в Казани на пятом партнеринге с новой программой, вопросами и предложениями».

Как показала практика предыдущих лет, мероприятие привлекает внимание большого количества представителей фармацевтического сообщества, что зарекомендовало его как площадку для серьезного и продуктивного диалога между властью и бизнесом. В этом году в партнеринге приняли участие более 200 человек – первые лица профильных министерств и ведомств, руководители фармкомпаний и представители бизнес-объединений. По традиции главной темой мероприятия 2016 года стало правоприменение регуляторных новелл текущего года и особенности выполнения задач лекарственного обеспечения населения с учетом данных законодательных изменений.

V МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «GEP-RUSSIA – 2016»

27–28 сентября 2016 года FAVEA Group провела юбилейную конференцию для инженеров фармацевтической отрасли. Лейтмотивом всей конференции стала тема технического решения организации производства нестерильных твердых лекарственных форм, включая внедрение и применение организационных и технических мероприятий для обеспечения достаточной защиты выпускаемой продукции от перекрестной контаминации. В этом году мероприятие посетили порядка 160 специалистов промышленных предприятий, эксплуатирующих чистые помещения и инженерные системы, проектных организаций и институтов, международных инжиниринговых компаний. Свои доклады представили 16 спикеров, в том числе представители профильных органов власти. Информационную поддержку «GEP-Russia» традиционно осуществляли научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» и «Новости GMP».

Юбилейная международная конференция по надлежащей инженерной практике в 2016 году позволила участникам мероприятия не просто ознакомиться с актуальными проблемами производства твердых лекарственных форм, но и узнать о современных технических решениях этих проблем. Среди главных вопросов, вызвавших наибольший интерес, обсуждались особенности проектирования производства твердых лекарственных форм в соответствии с требованиями GMP, технические решения при производстве стандартной номенклатуры и высокодействующих лекарственных средств, комплексные решения по упаковке в блистер твердых лекарственных форм, внедрение квалификации и валидации в жизненный цикл проекта, а также детально рассматривался сам жизненный цикл проекта по строительству предприятия, специализирующегося на выпуске твердых лекарственных форм.

Директор департамента качества FAVEA Group **Зденек Павелек** познакомил гостей конференции с практическими аспектами управления общими проектами, которые закреплены в руководстве ISPE «Good Practice – Project Management for the Pharmaceutical

Industry». Согласно данному руководству жизненный цикл проекта состоит из таких фаз, как инициация проекта, которая включает в себя технико-экономическое обоснование и концептуальную проработку, планирование (в т.ч. планирование поставок проекта) и непосредственно саму поставку проекта, включая проектирование, внедрение и завершение проекта. Спикер обратил внимание, что при проведении технико-экономического обоснования проекта всегда следует проводить оценку следующих параметров:

- номенклатура продукции;
- рынки;
- лицензионные ограничения;
- регуляторные требования;
- степень исполнения/неисполнения проекта;
- объемы продаж;
- цены продаж;
- предполагаемые издержки;
- предполагаемый результат бизнеса;
- управление проектом;
- способ коммуникаций;
- предварительный график.

Реализуя любой проект, мы всегда должны помнить о потенциальных рисках. Так, на стадии инициации проекта имеются бизнес-риски: безопасность, время, локализация, цена, ресурсы, график, объем, комплексность процесса и валидации, потребности производства и регуляторные требования. При планировании можно столкнуться с рисками поставки проекта. Чтобы избежать и минимизировать потенциальные риски, необходимо не просто проводить анализ ситуации, но и разрабатывать, а затем придерживаться валидационного мастер-плана. Осуществляя поставку проекта, всегда требуется оценивать риски по эксплуатации, планово-предупредительному ремонту, соответствию требованиям GxP и стандартам в области экологической безопасности, здоровья граждан.

В рамках определения правильной концепции общего проекта для производственной единицы по твердым лекарственным формам ISPE рекомендует исходить из классификации выпускаемой продукции. Правильную концепцию можно принять в первую очередь только с точки зрения защиты от перекрестной контаминации. Эта концепция описывается в технико-экономическом обосновании, а затем прорабатывается в рамках концептуального и базового проекта, рабочих чертежей. Все указанные документы находятся под полным контролем службы качества и являются базисом для правильной реализации, квалификации, пуско-наладки и эксплуатации производственных единиц по твердым лекарственным формам.

Учитывая рекомендации ISPE и собственный богатый опыт в области обеспечения качества на различных фармпредприятиях, **Зденек Павелек** рекомендует при планировании поставки проекта уделять пристальное внимание еженедельному контролю проекта посредством мониторинга исполнения утвержденного бюджета, текущих работ по проекту, ежедневных издержек, процента выполненных работ и финансовых издержек. По итогам проведенного мониторинга следует провести совещание проектной группы с составлением протоколов или базы данных с заданиями либо официальных писем, направленных на внедрение корректирующих действий. При этом спикер предостерегает исполнителей проекта о том, что нельзя ни в коем случае забывать осуществлять контроль издержек, которые могут возникнуть в процессе или после корректирующих действий.

Инженер-технолог и эксперт-аудитор GMP в компании FAVEA Group **Петр Шотурма** убежден, что принципиально важным с точки зрения обеспечения качества является выбор оборудования для производства твердых лекарственных форм, которое имеет встроенные современные системы контроля и мониторинга процесса и показателей качества. Для этого необходимо обладать информацией о свойствах обрабатываемых продуктов и требуемых критических показателей качества и критических параметров процесса на каждой производственной стадии. В своем докладе **Петр Шотурма** как раз подробно остановился на определении этих критических точек для последующей валидации и выработки стратегии контроля. Чтобы определить, какая стадия и операции и в какой степени подпадают под требования GMP и подлежат квалификации и валидации, спикер рекомендует использовать подход оценки влияния параметров на показатели качества, который описан в руководстве ICH Q8 «Фармацевтическая разработка». Однако согласно замечанию докладчика «в постсоветских странах все еще встречается традиционный эмпирический способ определения критических показателей

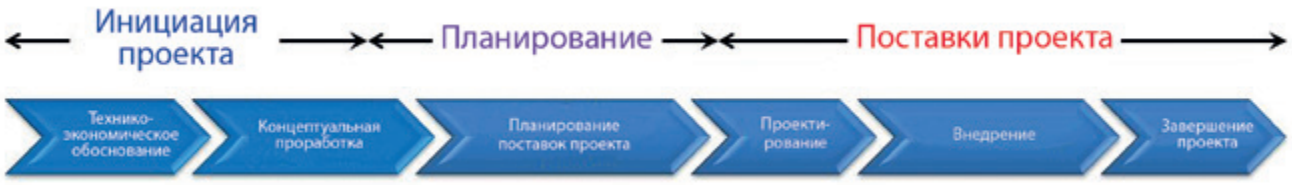


Рисунок 1. **Жизненный цикл проекта**

качества и параметров процесса, берущих свое начало от временных технологических и промышленных регламентов, которые разрабатывали предприятия и утверждали в Минздраве СССР до проведения валидации». Упомянутая традиционная система контроля качества лекарственных препаратов основана на трех составляющих: входной, межоперационный и приемочный контроль готовой продукции. «В период СССР основной акцент делался на необходимости контроля максимально возможного числа параметров процесса и показателей качества продукта», – пояснил **Петр Шотурма**. До сих пор такая модель используется на большинстве предприятий постсоветского пространства, и «традиционно ответственность за поддержание такой системы полностью возложена на службу качества предприятия».

Известно, что ни правила GMP, ни любой другой отраслевой стандарт не определяют, какое качество полупродукта или нерасфасованного продукта необходимо для получения готового продукта, соответствующего спецификации. В современных условиях производитель должен выполнить анализ всего технологического процесса на этапе фармацевтической разработки и четко определить критические показатели качества, шаги, параметры процесса, критерии приемлемости по критическим параметрам и критические единицы оборудования и приборы. Для последовательного решения проблематики процессов и качества **Петр Шотурма** рекомендует разбить технологический процесс на отдельные шаги, позволяющие определить:

- где формируется каждый параметр качества,
- где на каждый показатель качества могут действовать различные факторы,
- каким образом можно контролировать показатель качества,
- каким образом можно использовать показатель качества для управления процессом.

Критический показатель качества *– физические, химические, биологические или микробиологические свойства и характеристики, которые должны находиться в соответствующих пределах для обеспечения требуемого качества препарата.*

Критический параметр процесса *– параметр процесса, вариабельность которого влияет на критические характеристики качества и который вследствие этого подлежит мониторингу или контролю для обеспечения желаемого качества препарата.*

«Только логическая, неформальная и комплексная разбивка технологического процесса на отдельные шаги с полным анализом показателей качества и оценкой рисков процесса может содействовать обеспечению качества», – убежден эксперт. Такая позиция гарантирует четкий подход к валидации, поскольку опирается на совершенное знание процесса и его критических шагов, которые играют решающую роль в обеспечении качества продукции и соблюдении правил GMP.

«Специалисты фармацевтических компаний должны искать ответы на вопросы «какие параметры технологического процесса необходимо подвергать валидации?», «какие параметры будут наиболее критичными для производства лекарственного средства?», «какие показатели качества контролировать и как часто?», «какие показатели качества включать в спецификацию для контроля и мониторинга промежуточной и нерасфасованной продукции?», «как часто подвергать мониторингу показатель качества и на каких операциях?», «какие действия необходимо предпринять в случае получения результата за пределами спецификации?». От полноты ответов на данные вопросы зависит, насколько предприятие готово к прохождению валидации производственного процесса и выпуска качественной продукции», – считает **Петр Шотурма**. В результате специалисты фармацевтических компаний должны прийти к пониманию, что не все показатели качества и параметры процесса одинаково важны для обеспечения качества выпускаемой продукции. Более того, знание критических точек позволяет провести выбор соответствующего производственным задачам оборудования и предложить стратегию контроля в процессе производства.

Рисунок 2. Взаимосвязь «разработка – валидация»

Преподаватель университета прикладных наук Albstadt-Sigmaringen профессор **Рольф Юнг** познакомил участников конференции с концепцией закрытой производственной линии, которая является универсальным ответом на существующую ситуацию в производстве твердых лекарственных форм. Данную ситуацию профессор характеризует следующим образом: «Новые препараты, как правило, уже в самых малых дозировках высокоактивны и представляют риск для здоровья сотрудников производства. Это

подвигло большое количество компаний создать собственное производство высокоактивных продуктов. Зачастую они используются недостаточно и капитальные затраты на индивидуальную защиту и защиту окружающей среды, а также текущие расходы, связанные с соблюдением защитных мер, значительно выше. Продукция предлагается во множестве разнообразных вариантов, в результате чего количество на вариант уменьшается и переналадка производства становится все более распространенным явлением. Времени на очистку и настройку больше, а времени на эффективное производство меньше. Тенденция переходит от большого оборудования к нескольким мелким установкам».

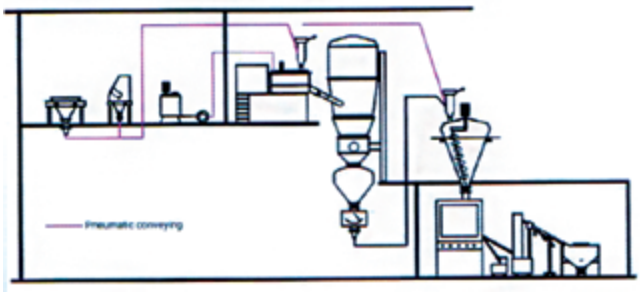


Рисунок 3. Новая концепция производства твердых лекарственных форм

Что же представляет из себя концепция закрытой производственной линии? Ее отправной точкой является закрытая производственная линия. Таким образом, в процессе производства на установке никакого вмешательства не происходит. Среди базовых правил применения представляемой линии профессор **Рольф Юнг** отметил следующие положения:

1. Прежде чем происходит заключительный этап очистки и сушки, система полностью закрывается. Если во время производства возникает необходимость вмешательства, материал на установке должен быть утилизирован и установка должна быть полностью очищена. Принцип такой же, как и в стерильном производстве в изоляторе.
2. Поскольку все этапы производства и очистки были проверены, открывать систему требуется только в исключительных случаях.
3. Если установка действительно пригодна для CIP (Cleaning-in-Place – безразборная мойка), то каких-либо требований в отношении рабочей среды нет и оборудование может быть установлено в технической зоне.
4. Поскольку система полностью закрыта, вся продукция может производиться одинаково, независимо от того, высокоактивные вещества или нормальные.
5. Использование комплекса пневмовакуумного транспортирования позволяет отказаться от применения контейнеров. Уменьшение помещений и транспорта, без промежуточного хранения.
6. Понимание рисков взрыва при обработке большого количества порошка или гранул увеличивается, защитные меры расширяются. При пневмовакуумной транспортировке опасность взрыва исчезает.

Представленная спикером закрытая производственная система включает в себя производство таблеток от взвешивания до таблетирования. Производительность при этом достигает 1000 кг/день и разделена на 6 партий, то есть годовая производительность составит около 500 млн таблеток при средней массе продукта 400 мг. Для производства другого продукта достаточно просто провести очистку системы.

Профессор **Юнг** не просто рассказал о возможностях применения закрытой линии – он крайне подробно описал и познакомил участников конференции с такими производственными этапами, как взвешивание, грануляция, конечное смешивание и таблетирование.

Взвешивание сырья осуществляется в весовой. При этом некритичное сырье взвешивают открытым способом в рабочей среде и пневматически транспортируют через весы-дозатор в первый блок обработки, смеситель с большими сдвиговыми усилиями (High Shared Mixer, HSM). Высокоактивное сырье взвешивают в защитной камере с перчатками и также пневматически транспортируют в HSM. Все взвешенное в защитной камере сырье для шести партий остается в защитной камере, прежде чем защитная камера и вся система будут закрыты. В конце процесса остатки сырья и отходы утилизируются в полиэтиленовых пакетах, а в защитной камере перед открытием прово-

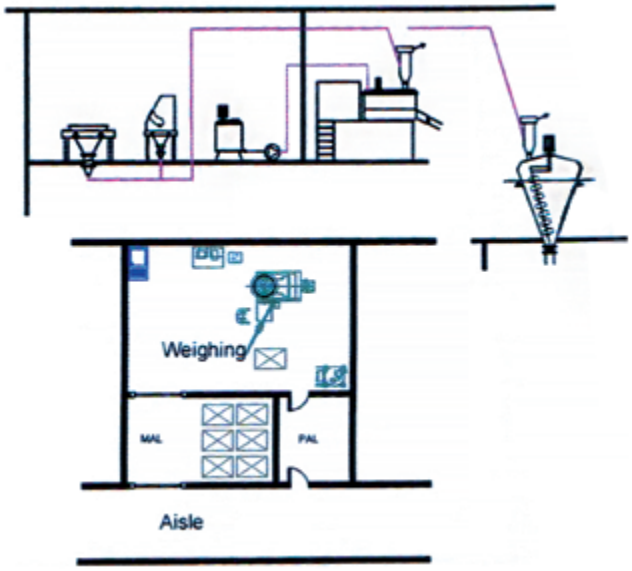


Рисунок 4. План взвешивания

дится влажная очистка. Поскольку в весовой сырье обрабатывается открытым способом в рабочей среде и защитная камера открыта, требуется чистая рабочая среда в соответствии с GMP.

При грануляции используется стандартная конфигурация HSM и сушилки с псевдоожиженным слоем FBD (Fluid Bed Dryer), оснащенная CIP. Установка остается закрытой, поэтому каких-либо требований к рабочей среде не возникает, как и к установкам в технической зоне. Если же их необходимо открыть, повторяется очистка или хотя бы ее последний этап.

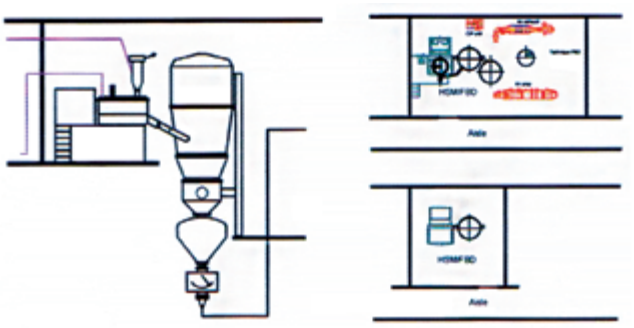


Рисунок 5. Схема грануляции

Для конечного смешивания используется конусный смеситель принудительного действия. Подача производится пневматически из FBD через сито. Добавки пневматически транспортируются из весовой. Для проверки эффективности грануляции смеситель располагают на тензомерах. Выходное отверстие смесителя расположено непосредственно над таблеточным прессом. Это гарантирует целостность готовых гранул. Смеситель имеет функцию CIP, а значит, его не требуется открывать. По фиксированной связи через пневмотранспортирование с FBD система может оставаться закрытой до выходного отверстия смесителя. Именно поэтому смеситель устанавливают в технической зоне. Выборка отсутствует. Однородность содержимого перепроверяется.

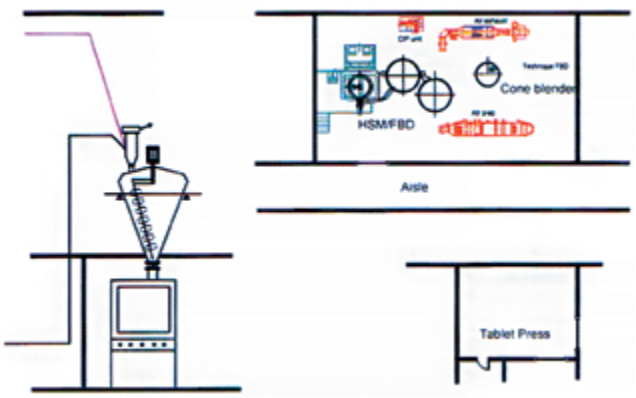


Рисунок 6. Схема конечного смешивания

Для надежности процесса таблетирования используется односторонний таблеточный пресс, который может прессовать партию массой до 160 кг. После завершения производства шести партий таблеточный пресс перед открытием подлежит предварительной влажной очистке. Дальнейшая очистка и установка на следующий день или другого продукта проходит в обычном рабочем режиме. Для концепции поточного производства моечная, предназначенная исключительно для таблетирования, находится рядом с таблеточным прессом. Таблетки собираются в специальные контейнеры, каждый из которых получает партию. Для начала процесса устанавливается шесть контейнеров, которые соединяются через пылеуловитель для таблеток и металлодетектор с таблеточным прессом. Таким образом, при производстве шести партий использование контейнеров не требуется.

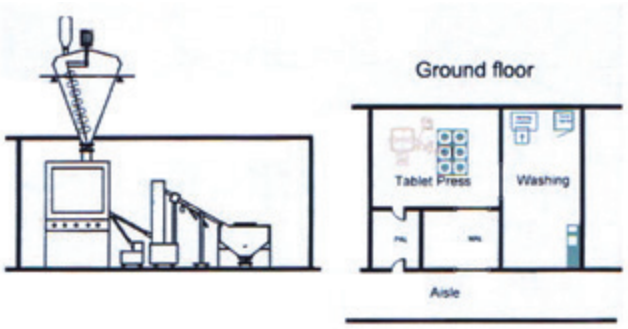


Рисунок 7. Схема таблетирования

Для стандартных продуктов соединение между прессом, пылеуловителем/металлодетектором, распределителем таблеток и контейнером для таблеток открыто. В случае с высокоактивными продуктами эти соединения закрываются пластиковым шлангом. После завершения производства блоки и контейнеры распираются, пластиковая трубка приваривается к большей площади и разрезается на части в центре. Это необходимо для обеспечения и гарантии герметичности всего оборудования и контейнеров. Поскольку таблеточный пресс открыт, а другие устройства и контейнеры при поставке материалов и выходное отверстие по меньшей мере открываются на некоторое время, в таких случаях требуется чистая среда.

Подводя итоги, профессор **Рольф Юнг** подчеркнул высокую гибкость и экономическую эффективность представленного процесса производства нерасфасованной продукции твердых лекарственных форм. Так, концепция закрытой линии производства позволяет в общем уменьшить площади и существенно сократить количество чистых зон: «Транспортирование

материала ограничивается сырьем и готовыми таблетками. Можно использовать предлагаемые на рынке оборудование и технологии. Система подходит для всех видов сырья, независимо от их фармакологической активности».

Про оптимальную организацию участка по производству твердых лекарственных форм с точки зрения проектирования участникам конференции **GEP-Russia** рассказал независимый консультант Boneh Consulting, Pharma Engineering **Ури Боне**, сосредоточившись на практических вопросах по поступлению сырья, отбора проб, хранения, фасовки, грануляции, смешивания, таблетирования и капсулирования, покрытия оболочкой, упаковки и поставки. Старший эксперт по развитию рынка Bosch доктор **Мартин Опиц** поделился своим опытом в области технологий изготовления капсул из различных полимеров, эффектов хранения, машинной производительности, возможности масштабирования различных принципов заполнения и новых технологий доставки лекарственных средств. Директор по продажам Pharma Technology **Эрве Денгис** рассказал о таком сложном процессе, как обеспыливание таблеток и полировка капсул. Спикер особо подчеркнул, что «неправильное или неэффективное выполнение этих процессов может привести к значительному снижению эффективности работы всей производственной линии». Более того, несмотря на тщательную отлаженность процесса, всегда существует возможность его улучшения.

Помимо выше рассмотренных презентаций, в первый день V Международной конференции **«GEP-Russia – 2016»** с докладами выступили директор по производству твердых лекарственных форм TEVA CZECH INDUSTRIES **Рихард Сзрайбер**, представитель компании IMA SAFE и директор «ГИЛС и НП» **Владислав Шестаков**.

Второй день конференции прошел в формате кейсов, посвященных теме непрерывного производства твердых лекарственных форм и комплексных решений в этой области, а также представлении актуальных разработок по упаковке продукта. Региональный менеджер по развитию проектов GEA Pharma Systems **Оскар Голдштейн** отметил, что сегодня практически все признают преимущество непрерывного призводства для фармацевтического сектора. «Гарантия качества в режиме реального времени обеспечивается применением встроенных процессно-аналитических систем (PAT), которые непрерывно отслеживают условия процесса и качество продукта, а также связаны с автоматической регулировкой параметров процесса. Это облегчает выпуск продукции на фоне менее инвазивного нормативного контроля и сокращает использование ресурсов и энергии, снижает потери продукта и отходов производства, сводит к минимуму время простоя», – резюмировал спикер. Более того, возможность запуска установок непрерывного производст-ва в течение длительного периода снижает потери продукта, связанные с каждым пуском и остановкой линии, а высокая степень автоматизации сводит к минимуму необходимость ручного вмешательства.

Владислав Шестаков

Технический специалист Iholland **Зои Колман** рассказала о возможностях увеличения производительности таблеточного пресса за счет пресс-инструментов, а региональный директор по Восточной Европе и Центральной Азии IWK Verpackungstechnik GmbH В**италий Батырев** привел данные об использовании картонирующих машин в фармацевтическом секторе с учетом требований стандартов GMP, GLP и GCP в отношении упаковочного оборудования. О проектировании и внедрении в жизнь упаковочных решений для готовых лекарственных средств говорили представители Dividella, IMA SAFE и профессор **Рольф Юнг**. Если представители указанных компаний старались максимально подробно рассказать о своих ноу-хау, то профессор **Юнг** провел сравнительный анализ перспектив переноса упаковки таблеток в Индию или страны с низкой оплатой труда. Согласно данным спикера, затраты на один блистер в Индии составляют примерно 0,05 евро, в то время как в Европе или Америке самая минимальная сумма варьируется в диапазоне 0,1–0,6 евро за блистер. Учитывая, что все расходы на производство фиксированы и в сжатые сроки подстроить их под изменяющиеся условия производства практически невозможно, следует учитывать четыре базовых составляющих расходов:

- строительство и оборудование в форме процента стоимости, амортизации, техобслуживания и проч.;
- долгосрочная эксплуатация зданий и оборудования, то есть электроэнергия, уборка помещений и т.д.;

- расходы на персонал;
- прочие расходы, не превышающие 10% от общей суммы.

Профессор **Рольф Юнг** привел практический пример организации упаковочной линии в Германии и сравнил полученные затраты на производство одного блистера с данными по Индии. В представленном примере были использованы четыре варианта снижения расходов:

1. Снижение инвестиций в строительство

Сокращение ширины линий и пролета с «комфортных» до «необходимых», отказ от всех участков складирования путем оптимизации потоков материала на входе, оснащение зоны GMP и циркуляция воздуха только на этапе первичной упаковки – все эти меры привели к сокращению площади примерно на 16%, инвестиций и текущих расходов на здания – на 20% каждый. То есть расходы на блистер сократились только на 4–5%.

2. Увеличение инвестиций в линии упаковки для увеличения производительности линии

Более быстрые линии упаковки увеличивают инвестиции примерно на 15%, а рост производительности в этом случае – на 1/3 (производительность достигает 80 ходов в минуту). Таким образом, расход на блистер уменьшается более чем на 20%. Следовательно, использование эффективного оборудования – это лучший способ сократить расходы на производство конкретных изделий.

3. Улучшение организации и обучение сотрудников

Улучшая поток материалов в прямом сообщении склада с упаковочными линиями, можно сократить количество сотрудников, занятых на транспортировке, а также обеспечить бесперебойную работу одного погрузчика на складе и в конце упаковочных линий. «На стадии первичной упаковки транспортные изменения приведут к остановке материала. Сотрудники, работающие на линии, вовлекаются в процесс очистки и ввода в эксплуатацию. После соответствующего обучения работники линии станут частью бригад пуска, а число механиков можно будет сократить. Интенсивное обучение, занимающее около 1 года, поможет сократить количество операторов до 2 человек на линию», – пояснил профессор **Юнг**. В целом сокращение числа сотрудников обеспечивает снижение расходов на 18%.

4. Увеличение времени работы оборудования путем сокращения времени на смену продукции

Сокращение на 20–25% оптимизированных процессов организации, параллельной подготовки к пуску и отработанного времени на смену продукции приводит к 18% снижению затрат на производство упаковки.

Конференция продолжилась докладами менеджеров IMA Swiftpack и «Тэсто Рус» об изолирующих технологиях, счетной фасовке и автоматизированном мониторинге, контроле параметров микроклимата в чистых помещениях с применением специализированного оборудования. **Ури Боне** рассказал об особенностях внедрения квалификации и валидации в жизненный цикл процесса с учетом недавно обновленного приложения 15 европейской нормативно-правовой базы Eudralex, том 4.

Валидация *– это процесс создания документальных доказательств, показывающих, что процедура, процесс или деятельность, осуществляемая на производстве, или тестирование соответствуют заданным параметрам и поддерживают необходимый уровень выполнения на всех этапах.*

Спикер напомнил участникам конференции, что при общей валидации проекта следует помнить о необходимости следующих определений в отношении требований к «общему» объекту:

- Техническое обеспечение – физические аспекты (здание, оборудование, трубопроводы и иные материальные составляющие объекта).
- Программное обеспечение – установленные методы и процедуры эксплуатации, контроля и технического обслуживания производственного объекта.
- Контроль – аудит и утверждение общего производственного объекта, то есть программа обеспечения качества.

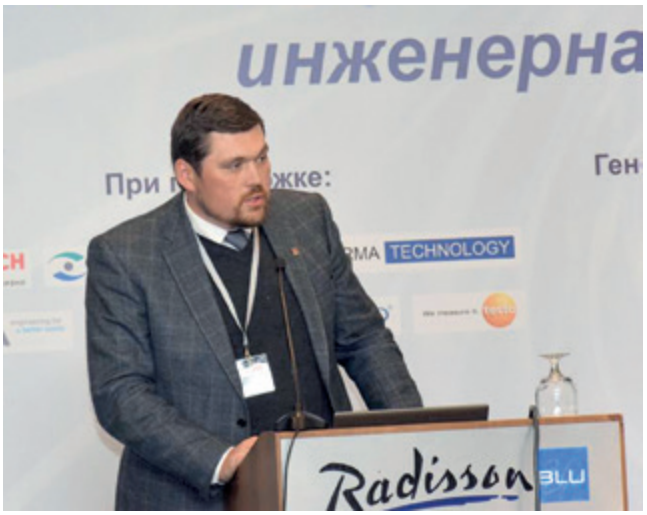
Поскольку основной валидационный план определяет ключевые элементы квалификации производственного предприятия и программы проверки, он должен включать в себя или ссылаться на политику квалификации и валидации, организационную структуру (включая роли и обязанности персонала), общую информацию об объектах, оборудовании, системах и процессах, необходимые мероприятия валидации, необходимую документацию, критерии приемки и контроль над изменениями. Далее **Ури Боне** подробно остановился на каждом этапе квалификации проекта, раскрывая его суть и особенности, начиная от спецификации требований пользователя и заканчивая повторной квалификацией.

Зденек Павелек обратил внимание участников конференции на такой немаловажный аспект жизненного цикла производства, как программа планово-предупредительного ремонта, о котором край-

не редко говорят на семинарах и иных мероприятиях для специалистов фармацевтического рынка. В правилах GMP имеются требования к системам и оборудованию, согласно которым их следует содержать в приемлемом рабочем состоянии за счет внедрения соответствующих контрольных операций, регулярного планово-предупредительного ремонта, проведения необходимых исправлений/доводки/наладки, регулярной квалификации, поверки, калибровки и верификации. Однако, как заметил спикер, правила GMP не содержат руководства по обеспечению указанных операций. Зато организация ISPE в руководстве «Good Practice Guide: Maintenance» приводит практическую информацию по обеспечению требований GMP и эксплуатации производственных единиц. Согласно этому руководству базовая концепция планово-предупредительного ремонта представляет собой трехуровневую систему:

1. Основная практика планово-предупредительного ремонта – проводится для оборудования, систем и производственных единиц для обеспечения уровня надежности и производительности, который требуется в организации.
2. Надлежащая практика планово-предупредительного ремонта – проводится сверх рамок основной практики для оборудования, систем и производственных единиц, у которых оценка риска идентифицировала влияние на безопасность пациентов или качество продукции.
3. Лучшие практики планово-предупредительного ремонта – проводятся сверх рамок надлежащей практики планово-предупредительного ремонта и обычно служат для технологических целей.

На практике, как правило, применяются два взаимодополняющихся типа планово-предупредительного ремонта: проактивный (проведение операций для поддержания стандартной работы систем и оборудования) и реактивный (проведение операций с целью устранения инцидентов, сбоев, аварий). Производитель лекарственных препаратов самостоятельно выбирает или разрабатывает собственную стратегию планово-предупредительного ремонта, которая исходит из описания системы и классификации ее компонентов, оценки рисков, рекомендаций производителей оригинального оборудования, пересмотра исторической информации, опыта работы с подобным оборудованием, требований процессов, интервалов и допусков, стратегии и требований по запасным частям. Сегодня большинство фармацевтических компаний использует для проведения планово-предупредительного ремонта форму аутсорсинга, стратегию которого определяют и регулярно актуализируют с учетом объема, способа проведения, уровня документации, доступности по времени и издержек по сравнению с проведением планово-предупредительного ремонта своими силами. [О специфике проведения и важности планово-предупредительного ремонта более детально написано в материале «Техническая поддержка высокотехнологичного оборудования для химико-фармацевтической промышленности» научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», № 3(16) за август 2016 г., с. 298–300.]



Евгений Шмаков

Второй день юбилейной конференции **GEP-Russia** завершился докладами представителей инжиниринговых компаний о менеджменте полного жизненного цикла производства твердых лекарственных препаратов. В своих докладах представители указанных компаний отметили все чаще проявляющуюся на рынке тенденцию, когда производители и дистрибьюторы оборудования все больше выступают в качестве консультантов, оказывая помощь и поддержку на всех этапах процесса производства любых лекарственных форм. Руководитель центра надлежащих инженерных практик ФБУ «ГИЛС и НП» **Евгений Шмаков**, учитывая колоссальный опыт возглавляемой им инжиниринговой компании (в составе ГК «Фармконтракт»), рассказал о ключевых точках и зонах риска основных стадий проектирования и строительства производственного участка.

V Международная конференция по надлежащей инженерной практике **«GEP-Russia – 2016»**, сконцентрировавшись на современных подходах и технических решениях организации производства лекарственных форм, собрала на одной площадке широкую аудиторию специалистов, регулярно сталкивающихся в своей работе с обсуждаемыми проблемами и рисками. Мероприятие по праву сохраняет статус крупнейшего события в области надлежащей инженерной практики.

САММИТ «PHARMASTRATEGIES-2017»

3–4 октября 2016 года компания infor-media Russia провела на площадке конгресс-центра отеля «Swissôtel Красные Холмы» ежегодное мероприятие для специалистов фармацевтического рынка в традиционном формате двух независимых конференций: VIII Международной конференции «Что происходит на фармацевтическом рынке?» и VII аптечного саммита «Эффективное управление аптечной сетью». Консолидация регуляторов, производителей, дистрибьюторов и представителей аптечных сетей, профессионального сообщества и экспертов позволяет максимально оперативно решить самые острые вопросы, выработать общие стратегии развития отрасли, основанные на практике в формате «know-how».

Вопросы, связанные с изменением законодательства и сопутствующими этому процессу рисками для развития национального фармацевтического рынка, механизмы принудительного лицензирования, локализации иностранных производителей лекарственных средств, особенности взаимодействия страховых компаний, производителей и дистрибьюторов, тенденции к консолидации усилий ритейлеров – эти и связанные с ними темы активно обсуждали участники двухдневного саммита **«PHARMASTRATEGIES-2017»** в Москве.

Под брендом **«PHARMASTRATEGIES»** infor-media Russia уже несколько лет подряд проводит два независимых мероприятия, отражающих профессиональные интересы их участников: для представителей компаний-производителей лекарственных средств – конференцию *«Что происходит на фармацевтическом рынке?»*, для аптечных сетей – саммит по эффективному управлению.

VIII Международная конференция «Что происходит на фармацевтическом рынке?» прошла при поддержке крупнейших отраслевых ассоциаций – Ассоциации фармацевтических производителей и Ассоциации международных фармацевтических производителей. Открыл конференцию пленарный круглый стол, посвященный вопросам инвестиционной привлекательности фармацевтического рынка в условиях кризиса. Управляющий директор Ipson Healthcare **Олег Фельдман** и директор направления маркетинговых исследований и консалтинга Aston Group **Игорь Петрушин** рассказали о новых трендах и стратегиях выживания или ручного управления, которые вырабатывают компании под влиянием новых вызовов. Генеральные директора аналитических агентств DSM Group и IMS Health **Сергей Шуляк** и **Николай Демидов**, обсуждая драйверы роста и инвестиционный потенциал рынка, представили данные о реакции потребителей на изменение (повышение) цен на лекарственные препараты, прогнозируя серьезный сдвиг в потребительских предпочтениях в ближайшем будущем.

В рамках пленарной дискуссии *«Взгляд международной фармы на планирование 2017 года»* ТОП-менеджеры из российских представительств EY, Sentiss, «Босналек», «Ипсен» и Abbot рассказали о том, как зарубежные производители оценивают инвестиционный потенциал российского фармацевтического рынка, какие прогнозы закладывают в свои бизнес-

планы на будущий год. Так, старший вице-президент компании «Ипсен» по России и СНГ **Марина Велданова**, оценивая преобразования, произошедшие на отечественном рынке под влиянием трансформации законодательной базы, пришла к выводу, что «фокус на наше и не наше, различие правил, предъявляемых к отечественным и зарубежным компаниям, мешает развитию». Спикер назвала такой подход «драматичным разделением». В то же время она отметила, что происходящие структурные изменения рынка отражают его зрелость, позволяя с оптимизмом смотреть в будущее и надеяться на успешное развитие российского фармацевтического рынка, хотя «горизонты этого хорошего будущего пока не видны».

Следом за пленарной дискуссией о планировании бюджетов на 2017 год иностранными компаниями прошла аналогичная сессия, на которой свои ожидания от текущих и будущих преобразований представили российские производители лекарственных средств. В частности, первые лица ГК «Фармэко», «Фармасинтез», ГК «Биотэк» и «Нанолек» среди потенциальных источников финансирования отметили такие меры государственной поддержки национальных производителей, как специнвестконтракты. Например, президент компании «Нанолек» **Владимир Христенко** убежден, что без заключения таких долгосрочных контрактов невозможны вложения в инновационные продукты. Однако, по его мнению, «для фармы механизм требует несколько других элементов. Налоговые преференции менее важны. Ключевым элементом является обеспечение гарантированного заказа продукции в определенном объеме». Спикер обратил внимание коллег, что «основные инвестиции и инструменты поддержки крутятся вокруг рынка госзакупок. С одной стороны, государство подталкивает и дает возможность инвестировать в создание необходимых продуктов. Но дальше наступает ступор. Ты приходишь на конкурентный рынок, как сложится твоя судьба – большой вопрос. Надо понимать, что мы работаем с одним покупателем в разных ипостасях: будь то региональный, федеральный бюджет. Нам важно понимать, что настроение покупателя не изменится, так как все проекты долгосрочные».

Управляющий партнер по развитию бизнеса компании «Фармасинтез» **Олег Астафуров** акцентировал внимание участников дискуссии на проблемах, связанных со специнвестконтрактами: «Главная проблема СПИКов в том, что они совершенно не гарантируют, что государство будет закупать продукцию, в которую она инвестировала деньги. С точки зрения коммерсанта, такой подход не очень рационален».

Среди мер государственной поддержки, востребованных российскими фармкомпаниями и необходимых для дальнейшего увеличения импортозамещения, генеральный директор ГК «Биотэк» **Дмитрий Болдов** отметил постановление Правительства Российской Федерации от 03.01.2014 № 3 «Об утверждении Правил предоставления субсидий из федерального бюджета российским организациям на компенсацию части затрат на уплату процентов по кредитам, полученным в российских кредитных организациях в 2014–2016 годах на реализацию новых комплексных инвестиционных проектов по приоритетным направлениям гражданской промышленности». Данное постановление обеспечивает возможность получения компенсации процентной ставки по инвестиционным кредитам, взятым предприятием на реализацию комплексных инвестиционных проектов. «В настоящее время много отечественных предприятий смогли подписать договоры с Минпромторгом через фонд развития промышленности. Сейчас они могут субсидировать часть процентной ставки, которую тратят на обслуживание кредитов инвестиционного плана», – пояснил спикер. Наряду с этим еще одной действенной мерой поддержки является постановление Правительства Российской Федерации от 12.03.2015 № 214 «Об утверждении Правил предоставления в 2015–2016 годах субсидий из федерального бюджета организациям промышленности для возмещения части затрат, понесенных в 2015 и (или) 2016 годах на уплату процентов по кредитам, полученным в российских кредитных организациях и государственной корпорации «Банк развития и внешнеэкономической деятельности (Внешэкономбанк)», а также в международных финансовых организациях, созданных в соответствии с международными договорами, в которых участвует Российская Федерация, на пополнение оборотных средств и (или) на финансирование текущей производственной деятельности». По мнению **Дмитрия Болдова**, указанное постановление помогло предприятиям справиться с кризисом конца 2014 года и получить компенсацию возросшей процентной ставки: «По сути дела, мы получили денежные средства, которые фактически транслировали банкирам. Если говорить о нашей компании, то по этому постановлению за 2015 год мы получили 15 млн руб. Для сравнения – объем процентов по всем кредитам, которое заплатило предприятие, – 249 млн руб.». Что касается постановления Правительства Российской Федерации от 01.10.2015 № 1047 «Об утверждении Правил предоставления субсидий из федерального бюджета российским организациям на компенсацию части затрат, понесенных при реализации проектов по организации лекарственных средств и (или) производства фармацевтических субстанций, в рамках подпрограммы «Развитие производства лекарственных средств» государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013–2020 го-

ды», его действие сопряжено с рядом ограничений. «По данному постановлению в настоящее время мы не работаем. Возможности, которые прописаны программой, мы считаем недостаточными для того, чтобы стимулировать отечественную промышленность и производство субстанций», – отметил **Дмитрий Болдов**.

Безусловно, самые активные участники фармацевтического рынка не могли обойти стороной вопрос единого рынка ЕАЭС. Организаторы пригласили специального гостя – начальника отдела координации формирования общих рынков лекарственных средств и медицинских изделий Департамента технического регулирования и аккредитации ЕЭК **Дмитрия Щекина**. Специальный гость в формате интервью еще раз обратил внимание всех участников процесса производства лекарственных средств на понятие «взаимозаменяемость», о котором неоднократно в этом году рассказывали представители ЕЭК в рамках профильных конференций.

Директор ФБУ «ГИЛС и НП» **Владислав Шестаков** также в формате интервью рассказал о результатах инспектирования иностранных производителей лекарственных средств для медицинского применения: «По состоянию на 30 сентября в Минпромторг поступило 440 заявлений, около 336 документов передано в наш институт, проведено 87 проверок, по итогам которых 19 компаний получили отказ в получении сертификата. До конца года мы планируем провести в общей сложности 180 проверок». Отвечая на вопросы журналистов о специфике проведения проверок российских и иностранных производственных площадок на соответствие GMP, руководитель Государственного института лекарственных средств и надлежащих практик подчеркнул, что с 2016 года любая зарубежная компания, осуществляющая ввоз лекарственных средств на территорию Российской Федерации, обязана получить российский сертификат на соответствие GMP (ранее такие компании могли предоставлять сертификаты, полученные в других государствах). То же правило

действует и в отношении компаний, которые впервые регистрируют свои препараты в России. Более того, с 2017 года компании должны будут предоставлять российский сертификат для перерегистрации препаратов, уже находящихся в обращении на национальном рынке.

Участники пленарной сессии *«Стратегический вектор развития экономики России»* обсудили механизмы и актуальные шаги по улучшению инвестиционного климата, как необходимого фактора развития фармацевтической промышленности. В частности, речь шла об IP-защите, механизмах принудительного лицензирования, процедуре регистрации воспроизведенного лекарственного средства и эксклюзивности данных. Так, начальник отдела нормативно-правового регулирования вопросов лекарственного обеспечения и контроля качества лекарственных средств департамента лекарственного обеспечения и регулирования обращения медицинских изделий Минздрава России **Андрей Гайдеров** видит опасения возникновения дефицита лекарственных средств после принятия решения о принудительном лицензировании. Более того, по мнению представителя Минздрава России, принудительное лицензирование не должно использоваться для снижения цен: у государства есть другие возможности получить приемлемую цену: «На уровне правительства сейчас обсуждается механизм прямых переговоров с производителем лекарственного препарата. Создана межведомственная комиссия, которая стала площадкой для обсуждения введения такого механизма, иных методов закупок и так далее».

Вопросам ценообразования и внедрения процедуры принудительного лицензирования была посвящена отдельная сессия *«Закон и бизнес. Государственный заказ: изменение законодательства и основные риски и проблемы»*. Открывая сессию, заместитель генерального директора АРФП **Елена Масловская** отметила, что, несмотря на многочисленные обращения производителей и поручение Президента Российской Федерации, проблема вымывания лекарственных препаратов низкого ценового сегмента с аптечных полок до сих пор остается нерешенной. Зачастую несовершенство существующей системы ценообразования ставит производителя перед выбором: либо реализовывать такие препараты ниже себестоимости, либо останавливать производство.

Отсутствие единообразия в процессе госзакупок и порядке ценообразования, по мнению исполнительного директора СПФО **Лилии Титовой**, приводит к тому, что в разных регионах цены на один и тот же препарат отличаются в 2–2,5 раза. Одним из инструментов, который поможет исправить этот дисбаланс, может стать мониторинг обращения лекарственных средств

с помощью маркировки. «Пилотный проект по внедрению этого метода предполагается запустить уже в следующем году», – пояснила **Елена Масловская**.

Начальник управления контроля социальной сферы и торговли ФАС России **Тимофей Нижегородцев** дал производителям ряд рекомендаций по регистрации цен. Данные рекомендации были выработаны в ходе подведения итогов первого этапа международного сравнительного анализа цен на лекарственные препараты, находящиеся в обращении на национальном рынке. Этот анализ позволил выявить 48 лекарственных препаратов, цены на которые в России оказались выше минимальных цен в отдельных странах мира, в том числе в странах, являющихся референтными для России: «Мы предполагаем, что компании в некоторых случаях неумышленно повысили цены. Так как цены для отдельных препаратов были зарегистрированы как для российских лекарств, в то время как они всего лишь упаковывались в России. Мы придерживаемся международного соглашения, которое не предполагает, что упаковка достаточна для получения статуса российского». По словам **Тимофея Витальевича**, ФАС России ожидает, что компании начнут добровольно снижать цены. Заявителям спикер порекомендовал уходить от тарифного метода ценообразования, который имеет ряд существенных недостатков, и переходить на метод экономического анализа.

Директор по фармакоэкономике ГК «Р-Фарм» **Александр Быков** обратил внимание участников сессии на случаи «двойного обращения» дорогостоящих препаратов: «Очень часто препарат, закупленный по 44-ФЗ [Федеральный закон от 05.04.2013 № 44-ФЗ «О контрактной системе в сфере закупок товаров, работ, услуг для обеспечения государственных и муниципальных нужд»] в одном регионе, через некоторое время «всплывает» в другом по более низкой цене – фирмы-однодневки просто осуществляют вторичную противозаконную продажу препарата».

Большое внимание было уделено вопросам возможного введения процедуры принудительного лицензирования. **Тимофей Нижегородцев** подчеркнул, что цель регуляторов, предлагающих эту меру, – не девальвировать интеллектуальные права производителей, а прежде всего обеспечить безопасность населения страны. При этом предложение базируется на международной практике: введение процедуры принудительного лицензирования возможно только при совпадении ряда перекрестных требований в соответствии с международным правом. Оппоненты такой позиции ФАС России считают, что принудительное лицензирование должно быть «последним рубежом», применяемым только в случае угрозы национальной безопасности. «Это должен быть механизм, основная цель которого – не наказать нерадивых производителей, а сохранить здоровье населения», – считает управляющий партнер по развитию бизнеса компании «Фармасинтез» **Олег Астафуров**.

Завершилась конференция *«Что происходит на фармацевтическом рынке?»* обменом информацией представителей зарубежных компаний – производителей лекарственных средств, которые в той или иной степени осуществили локализацию на территории Российской Федерации. После представления так называемых рецептов выживания участникам конференции было предложено принять участие в одном из четырех круглых столов: «Альтернативный взгляд. СПИК: гарантии закупок или…?», «Рынок труда медпредов: отмирает ли этот класс?», а также круглых столов по дистрибьюции и для директоров по ОСТ-маркетингу и коммуникационных агентств.

Второй день саммита **«PHARMASTRATEGIES-2017»** был посвящен вопросам управления аптечной сетью. По сложившейся традиции генеральные директора крупнейших сетей обменивались опытом стимулирования эффективности бизнеса в фармдистрибьюции и ритейле, несмотря на кризисные тенденции и риски. Ключевой проблемой развития аптечной сети в современном мире становится отсутствие свободного места на рынке. Поэтому среди оптимальных путей развития участники VII аптечного саммита видят один: органический рост. «Сейчас идет борьба не за количество, а за локацию», – подчеркнул генеральный директор аптечной сети «Ригла» **Александр Филиппов**. Практически каждый представитель аптечной структуры отметил позитивную тенденцию развития рынка: после провального лета осенний сезон принес рост прибыли. Более того, президент ГК «Протек» **Вадим Музяев** заявил: «Фармацевтика – отрасль, которая никогда не находится в «кризисе». Завершился саммит церемонией награждения победителей международной фармацевтической премии «Зеленый крест».

ПЕТЕРБУРГСКИЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ ЗДОРОВЬЯ

12–14 октября на берегах Невы в четвертый раз профессионалы в области здравоохранения и фармацевтической промышленности собрались на единой площадке, которая консолидирует под одним брендом пять специализированных выставок, способствующих эффективному взаимодействию поставщиков научных разработок, медицинского оборудования и услуг с потенциальными инвесторами, закупщиками и медицинскими работниками: «Медиз СПб», «Фармация», «Биоиндустрия», «Health&Medical Tourism» и «Эстетическая медицина». В этом году в форуме приняли участие более 100 компаний из 14 стран мира, которые продемонстрировали медицинскую технику и оборудование, фармацевтические препараты, медицинские и оздоровительные услуги, разработки в области биотехнологий.

Приветствуя участников и гостей форума на торжественной церемонии открытия, вице-губернатор Санкт-Петербурга **Ольга Казанская** отметила популярность форума среди профессионального сообщества: «Эта выставка для профессионалов бесценна. Она позволяет переосмыслить взгляд на существующие в здравоохранении проблемы, ознакомиться с новейшими достижениями в сфере здоровьесберегающих технологий. Каждый год форум собирает огромное количество специалистов: экспертов из отраслевых министерств и ведомств, ведущих ученых страны и Санкт-Петербурга, знаменитых клиницистов, практикующих врачей-терапевтов. Всем интересно, что произошло за год, какие появились новинки». Более того, по словам вице-губернатора, ежегодное проведение ПМФЗ – это один из механизмов, работающих на привлечение в город бизнес-компаний для решения государственных задач в области современных технологий и качества медицинских услуг.

Впервые в рамках выставочной экспозиции Петербургского международного форума здоровья принял участие комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга, под коллективным стендом которого свои услуги представили Городской центр медицинской профилактики, фонд обязательного медицинского страхования, информационно-справочная служба «Здоровье города» и центры здоровья.

Международная выставка лекарственных препаратов, пищевых и биологически активных добавок «Фармация»

Международная выставка «Фармация» – это единственная специализированная выставка B2B-формата на Северо-Западе России, в которой принимают участие российские и зарубежные производители и дистрибьюторы лекарственных препаратов, пищевых и биологически активных добавок. В этом году гостям выставки был представлен широкий ассортимент продукции: лекарственные средства, БАДы и витаминно-минеральные комплексы, настойки и экстракты, водные и спиртовые растворы, диетические продукты. В первый день в рамках деловой программы прошла конференция *«Актуальные вопросы фармации»*, в которой приняли участие фармацевты, заведующие аптеками, специалисты отдела закупок аптечных сетей и медицинский персонал, отвечающий за оснащение медицинских учреждений. На конференции они смогли получить актуальную, достоверную и разноплановую информацию, необходимую для решения профессиональных задач. Особый интерес у гостей мероприятия вызвал доклад профессора кафедры внутренних болезней СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова **Лидии Хорошининой** о бактерии *Helicobacter pylori*, которая паразитирует на слизистой оболочке желудка человека и провоцирует развитие воспалительных и язвенных заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки. Как отметила спикер, известно, что почти 60% населения земного шара инфицированы *Helicobacter pylori* и не каждый инфицированный человек заболевает язвенной болезнью, хотя среди заболевших у большинства выявляется данная инфекция. «В настоящее время доказано, что наличие инфекции *Helicobacter pylori* при воспалительных заболеваниях желудка и двенадцатиперстной кишки является показанием к назначению антибактериальной терапии», – подчеркнула **Лидия Павловна**, рассказывая об авторской схеме эрадикации бактерии. Конференция прошла при поддержке Фармацевтической ассоциации Санкт-Петербурга и Северо-Запада России, председатель которой **Татьяна Зайченко** подчеркнула, что подобные встречи очень важны для обмена опытом и новыми знаниями.

Международная выставка-конкурс «Биоиндустрия»

Ежегодное отраслевое мероприятие, проходящее в формате выставки и конкурса, направлено на эффективное взаимодействие в рамках единой площадки поставщиков научных разработок в сфере биотехнологий с потенциальными инвесторами и производителями с целью создания инновационных продуктов в различных отраслях промышленности. Здесь крупнейшие научно-исследовательские институты ежегодно представляют достижения в области биомедицинской инженерии, а фармацевтические компании – инновационное оборудование и материалы нового поколения, разработки в области биофармацевтики и инновационных методов лечения. В этом году гости выставки могли ознакомиться с продукцией, разработанной и созданной с использованием микроорганизмов. ФБУНН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера презентовал диагностические тест-системы для применения в медицинской лабораторной практике, которые позволяют оценить состояние пациента, его систем, в частности мочеполовую систему, легочную систему, верхние дыхательные пути. «Есть наборы для твердофазного иммуноферментного анализа, есть тест-системы для культивирования микроорганизмов, есть сыворотки, которые реагируют со строго определенными микроорганизмами», – рассказал научный сотрудник института **Сергей Владимирович Борисенко**.

Петербургский международный форум здоровья – это глобальная площадка для обмена опытом и повышения компетенции специалистов фармацевтической и медицинской сферы. Это профессиональная площадка для обсуждения наиболее актуальных вопросов в различных областях медицины. Именно поэтому форум ежегодно проходит при поддержке не только профильных комитетов Санкт-Петербурга (комитета по здравоохранению и комитета по промышленной политике и инновациям) – форум поддерживают Минздрав и Минпромторг России, ФАНО России, а также крупнейшие профильные союзы и ассоциации, лучшие отраслевые СМИ страны.

«ПРАВОВЫЕ ВОПРОСЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ»

24 октября 2016 года The Moscow Times Conferences организовала в Москве конференцию по правовым вопросам развития фармрынка. Программа конференции включала три сессии, посвященные актуальным вопросам фармацевтической промышленности. В течение каждой сессий проходил опрос – интернет голосование по ключевым вопросам рассматриваемых тем.

В рамках первой сессии *«Рынок ЕАЭС. Нормативная база, регулирующая обращение лекарственных средств, и ее правоприменение»*, модератором которой выступила исполнительный директор Союза профессиональных фармацевтических организаций, **Лилия Титова**, спикеры обсуждали механизмы запуска единого рынка ЕАЭС и регистрации лекарственных средств на едином рынке. Представитель Министерства здравоохранения Республики Беларусь **Людмила Реутская** рассказала об особенностях правового обеспечения в сфере обращения лекарственных средств в государстве и интеграционных процессах в ЕАЭС. Спикер отметила, что Белоруссия готовится к переходу на Евразийские стандарты. На вопрос **Лилии Титовой**, уйдут ли с рынка старые (давно известные, «бабушкины») лекарства, может ли быть такое, что они не пройдут регистрацию, **Людмила Реутская** ответила: «Поскольку такие лекарства занимают определенную нишу рынка, для них предусмотрено сокращенное досье». **Дмитрий Рождественский**, представляющий Евразийскую экономическую комиссию, обратил внимание участников сессии, что некоторые давно известные препараты, широко востребованные у населения, используются не в фармацевтических целях, например борная кислота. Поэтому, по мнению спикера, необходимо найти силы для перевода таких препаратов в немедицинские средства. Обсуждались и трудности аттестации уполномоченных лиц на предприятиях, производящих медицинские газы. В Белоруссии таких предприятий на сегодня – 10, в России – 180.

Дискуссия по вопросам взаимозаменяемости лекарственных средств на едином рынке показала разное отношение спикеров к этой теме. Так, с одной стороны, оценка взаимозаменяемости вызывает много вопросов, ведь нельзя нормы взаимозаменяемости таблеток распространять на все лекарственные препараты (вакцины, радиопрепараты, медицинские газы). С другой стороны, доклад **Александра Быкова** (группа компаний «Р-Фарм») показал, что применение принципа взаимозаменяемости лекарственных средств позволило снизить цены на лекарственные препараты при государственных закупках и сэкономить бюджет. Что же касается рынка ЕАЭС, то, как подчеркнул **Дмитрий Рождественский**, оценка взаимозаменяемости не должна мешать регистрации

препарата и влиять на обращение лекарственных средств на общем рынке.

Есть существенные различия в законодательствах стран ЕАЭС и требованиях сторон. Так, Республика Казахстан настаивает на указании сегмента рынка, в 2017 г. в России запускается пилотный проект по маркировке и дальнейшее масштабирование. **Людмила Реутская** отметила, что единые правила маркировки приведут к серьезному удорожанию лекарственных средств, так что тема маркировки пока находится за рамками ЕАЭС. Однако **Лилия Титова** акцентировала внимание на том, что сейчас переговоры по обращению лекарственных средств в ЕАЭС идут в формате конструктивного диалога, евразийские нормы сформированы, 5 государств пришли с разными мнениями, а вышли с единым.

Подводя итоги сессии, модератор озвучила итоги онлайн-опроса по отношению участников рынка к общему регуляторному полю внутри ЕАЭС. Согласно этим данным, 35% ожидают потенциальный рост бизнеса в государствах ЕАЭС, а 65% – усиления конкуренции и снижения своей доли на рынке.

Тема второй сессии «*GMP-инспектирование производственных площадок. Гармонизация GMP*» вызвала большой интерес со стороны компаний – производителей лекарственных субстанций и препаратов как прошедших инспектирование, так и планирующих подать заявку на GMP-инспектирование в ФБУ «ГИЛС и НП». **Елена Денисова**, начальник отдела лицензирования производства лекарственных средств Минпромторга России, отметила, что на сегодня фармпредприятиям выдано 34 сертификата GMP и 22 отказа; завершенных инспекций гораздо больше, по итогам инспекции у компании есть 21 день доработать замечания и предоставить дополнительные документы в ФБУ «ГИЛС и НП». При отсутствии критических замечаний, менее пяти существенных и своевременно предоставленных дополнительных документов и устранения несущественных замечаний, может быть принято положительное решение о выдаче GMP-сертификата. В 2017 г. при отсутствии GMP-сертификата компания не сможет зарегистрировать новые препараты.

Основной проблемой при GMP-инспекции представители Минпромторга России отметили низкий уровень менеджеров фармкомпаний, работающих с министерством по этому вопросу.

Владислав Шестаков, директор ФБУ «ГИЛС и НП», отметил, что уровень проверяемых производственных площадок достаточно высокий, редко появляется эмоциональный фон или не готовность к инспекции. В настоящее время в ФБУ «ГИЛС и НП» 35 инспекторов, в 2017 г. штат инспекторов будет существенно увеличен.

На вопрос «Уверены ли Вы в качестве, уровне и беспристрастности российской инспекции GMP?» 30% проголосовавших участников ответили «Да», 70% настроены менее оптимистично.

Опрос в рамках третьей сессии был посвящен принудительному лицензированию. Результаты опроса «Нужно ли в России вводить принудительное лицензирование» распределились практически равномерно (45% убеждены в необходимости введения принудительного лицензирования, а 55% не готовы к такому шагу).

Модератором сессии «*Интеллекутальная собственность. Плюсы и минусы принудительного лицензирования. Параллельный импорт*» выступил **Вадим Кукава**, исполнительный директор Ассоциации «Фармацевтические инновации».

В России не было выдано ни одной принудительной лицензии (через суд). В гражданском кодексе Российской Федерации ч. 4 этот инструмент прописан с 2008 г. Пристальное внимание в настоящее время вопросу принудительного лицензирования уделяется в связи с проектом распоряжения Правительства Российской Федерации об утверждении плана мероприятий «Развитие конкуренции в здравоохранении». Спикеры – представители бизнеса – **Олег Астафуров** («Фармасинтез») и **Дмитрий Мордвинцев** (BIOCAD) отметили, что применение принудительной лицензии, обращение к этому инструменту – это крайний случай в фармацевтическом бизнесе в любой стране мира.

ФАРМКОНТРАКТ МЕДИА

РЕКЛАМНО-МАРКЕТИНГОВАЯ КОМПАНИЯ

ЭФФЕКТИВНОЕ ПРОДВИЖЕНИЕ И ВЫВОД ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА РЫНОК РОССИИ И СНГ

МЕРОПРИЯТИЯ | **ИЗДАТЕЛЬСТВО** | **ДИЗАЙН** | **ИССЛЕДОВАНИЯ** | **PR** | **DIGITAL**

Участие в **200** крупнейших отраслевых мероприятиях в год

Издание отраслевых книг **«под ключ»**

Общий тираж более **10 млн.** экземпляров

sponsor consulting – решение, выходящие за рамки традиционного спонсорского пакета!

Повышение квалификации в рамках образовательной лицензии №037755 от 08.08.2016

Проведение порядка 50 авторских семинаров и конференций, вебинаров от гуру и Богов вашей отрасли (привлечение международных экспертов)

Технические тексты, ориентированные на вашу ЦА и привлекающие покупателей

Лучшие журналы фармацевтической отрасли на русском и английском языках

Профессиональная площадка для представления производственных мощностей российских контрактныхпроизводств

Дизайн. Ребрендинг. Выделение ваших продуктов на конкурентном рынке

SEO продвижение. Контекстная реклама. SMM.

+7 (499) 258-11-06 INFO@PHCT-MEDIA.RU WWW.HHCT-MEDIA.RU

Журнал «Новости GMP» и выставка **Pharmtech & Ingredients** запускают новый проект по поддержке локализации и трансфера технологий в Россию

Новости GMP

pharmtech & ingredients

Что мы предлагаем?

1. **Поддержка диалога между компаниями**
2. **Интеграция на одной площадке участников рынка**
3. **Проектирование, инжиниринг и оснащение высокотехнологичным оборудованием**
4. **Технологическое сопровождение**
5. **Формирование портфеля продуктов**

Наши информационные партнеры:

PharmSource, Pharma IQ, Pharmaceutical manufacturing, Pharmaceutical online, Contract Pharma, Medical Product Outsourcing

Российские площадки, осуществляющие трансфер технологий:

Центр трансфера технологий ZUGE им. К.Д. Ушинского

ХимРар

Р-фарм

Фармкластеры

Новости GMP

+7 (499) 258-11-06

+7 (495) 252-00-98

info@phct-media.ru

info@gmpnews.ru

УДК 615.014.2

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ИННОВАЦИОННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДАРУНАВИРА ЭТАНОЛАТА

С.А. Золотов[1]* Н.Б. Демина[2], Г.Ф. Василенко[3], М.С. Демин[4]

1 – ООО «МБА-групп», 115230, Россия, Москва, Хлебозаводский проезд, 7, стр. 9

2 – ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8

3 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ, 127051, Россия, г. Москва, Петровский б-р, 8, стр. 2

4 – IMCD, 105316, Россия, Москва, Семеновская пл., 1а

1 – MBA-group, 7/9, Hlebozavodskiy proezd, Moscow, 115230, Russia

2 – I.M.Sechenov First Moskow State Medical University, Trubetskaya str., 8 Moskow, 119991, Russia

3 – Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2, Petrovskiy blv., Moscow, 127051, Russia

4 – IMCD Russia, 1a, Semenovskaya sq., Moscow, 195318, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: duim50@gmail.com

Резюме. В статье приведены результаты разработки состава и технологии капсул дарунавира этанолата. Для улучшения биофармацевтических характеристик в состав лекарственной формы вводили солюбилизатор Soluplus®. Изучение профилей растворения показало, что интенсивность и полнота высвобождения субстанции из капсул пропорциональны концентрации солюбилизатора. Результаты исследований показали необходимость изучения физико-химических характеристик субстанции дарунавира этанолата и могут быть использованы при разработке лекарственной формы инновационного препарата.

Ключевые слова: солюбилизация, дарунавир, увеличение растворимости, капсулы.

PERSPECTIVE OF INNOVATION DRUG FORMULATION WITH DARUNAVIR ETHANOLAT

S.A. Zolotov[1]*, N.B. Diomina[2], G.F. Vasilenko[3], M.S. Demin[4]

Abstract. Article shows the results of development and technological issues of darunavir ethanolate in capsule form. Soluplus was used to increase the biopharmaceutical characteristics of current drug formulation. Results of dissolution profile studies shows that intensity and release rate of API from the capsules are proportional to concentration of solubilizer and close to comparator agent. Results of the studies have shown necessity to research the physical and chemical characteristics of darunavir ethanolate substances and it could be used in the development of an innovative dosage form.

Keywords: solubilization, darunavir, increasing dissolution, capsules.

ВВЕДЕНИЕ

Общее число россиян, инфицированных ВИЧ, зарегистрированных в РФ на 14 мая 2015 года, составило 933419 человек [1].

ВИЧ-инфекцию вызывает вирус иммунодефицита человека, он относится к семейству ретровирусов (Retroviridae), подсемейству медленных вирусов (Lentivirus), его строение показано на рисунке 1 [2].

Проникая в организм человека, вирус связывается с клетками различных органов и тканей, но в первую очередь с клетками иммунной системы. Вирус разрушает и ослабляет функции пораженных иммунных клеток, поэтому у инфицированных людей постепенно развивается синдром приобретённого иммунного дефицита (СПИД) и, как следствие, повышенная чувствительность к широкому ряду инфекций, некоторым видам рака и другим болезням, которым могут противостоять люди со здоровыми иммунными системами [4].

Лекарственные препараты для лечения ВИЧ (антиретровирусные), применяемые в системе здравоохранения, контролируют репликацию ВИЧ, снижая вирусную нагрузку на организм жертвы [5]. Одним из часто включаемых в схемы лечения является противовирусный препарат дарунавир, относящийся ко второму классу ингибиторов протеазы ВИЧ 1. Дарунавир входит в список Всемирной организации здравоохранения основных, наиболее важных лекарственных средств, необходимых в базовой системе здравоохранения [6].

Дарунавир относится ко II классу БКС [7], а следовательно, обладает низкой растворимостью в физиологических средах, что может негативно сказаться на биодоступности, поскольку системной абсорбции подвергаются только растворенные вещества. Решение проблемы повышения растворимости субстанции в данном случае нуждается в особом внимании при разработке лекарственной формы. Разработка оригинальной лекарственной формы с высокой биодоступностью может стать одним из путей создания инновационного лекарственного препарата.

В настоящее время с позиции ICH Q8 среди функций лекарственной формы на первый план выходят обеспечение и контроль желаемого профиля высвобождения

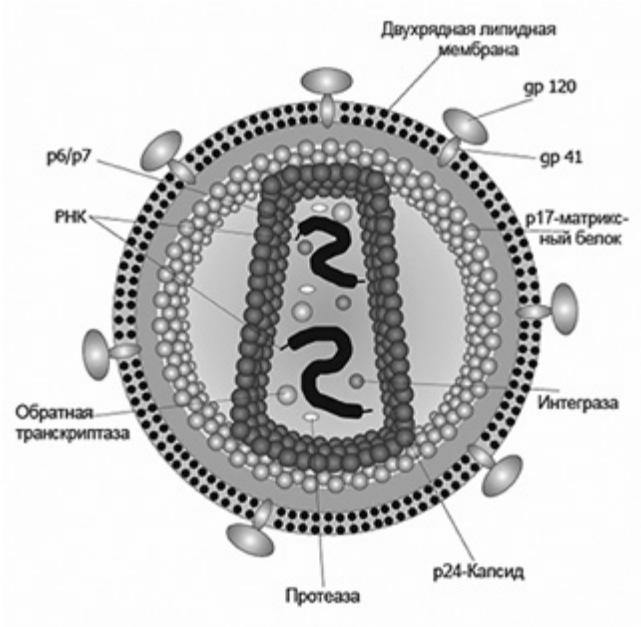


Рисунок 1. Строение вируса иммунодефицита человека [3]

действующего вещества [8], который тесно связан с растворимостью субстанции [9, 10].

Разработаны различные способы повышения растворимости фармацевтических субстанций: получение соединений включения, твердых дисперсий, сокристаллов и др. Большинство из них заключается в дополнительной обработке гидрофобных субстанций с помощью специфических технологий и оборудования перед включением в лекарственную форму. Одним из простых технологических решений проблемы недостаточной растворимости является солюбилизация. С этой целью в состав лекарственной формы вводят солюбилизирующие агенты, образующие водорастворимые структуры с лекарственными веществами [11, 12].

Одним из инновационных солюбилизаторов для фармацевтических целей является матричный полимер, состоящий из полиэтиленгликоля-6000, винилкапролактама и винилацетата (торговое название Soluplus®), показавший возможность увеличения растворимости плохо растворимых субстанций, таких как эстрадиол, пироксикам, клотримазол, карбамазепин, гризиофульвин, кетоконазол, циннаризин, фенофибрат, итраконазол, даназол и др., до нескольких раз [13]. Soluplus® впервые представлен профессиональной общественности в 2009 году в качестве вспомогательного вещества, а в октябре 2010 года получил награду Silver Innovation Award на выставке CPhI. Разработан для солюбилизации плохо растворимых фармацевтических субстанций и подходит для экструзии горячего расплава. Однако, по мнению производителя, его можно также применять в обычных процессах с целью использования его солюбилизационных свойств [14, 15 16].

Целью настоящего исследования являлось создание и изучение инновационной лекарственной формы дарунавира этанолата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали:

- дарунавира этанолат, субстанция-порошок, содержание дарунавира этанолата 99,8% («Баоджи Гиокан Биотехнолоджи Ко. Лтд», Китай), серия DR 150315, годен до 04.2020 (структурная формула дарунавира представлена на рисунке 2);

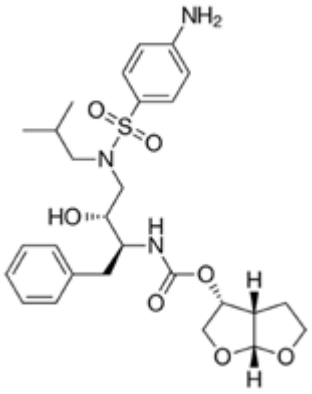


Рисунок 2. Структурная формула дарунавира

- препарат «Презиста, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг» (владелец регистрационного удостоверения – «Джонсон&Джонсон», Россия), серия MG8532, годен до 05.2018;
- вспомогательные вещества: силиконизированная микрокристаллическая целлюлоза (Si-МКЦ) Prosolv HD 90 (JRS); кросповидон Kollidon CL (BASF); диоксид кремния Aerosil 200 VV (Evonik); магния стеарат Ligamed MF-2-V (Peter Greven); матричный полимер Soluplus®, состоящий из полиэтиленгликоля-6000, винилкапролактама и винилацетата (BASF) (структурная формула приведена на рисунке 3).

Для получения лекарственной формы использовали капсулы размером 00, Capsugel, на основе гидроксипропилметилцеллюлозы, капсулы обладают меньшим количеством влаги и подходят вегетарианцам, иудеям, мусульманам в связи с тем, что не содержат животного сырья.

Оборудование для получения лекарственной формы:

- ручная капсулонаполняющая машина Profiller 2007 (Capsule connection, LLC, США);
- сита ручные с отверстиями размером 0,315 мм и 0,8 мм (ООО «Вибротехник», Россия);

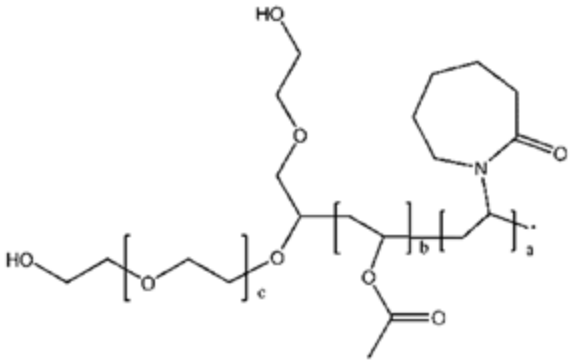


Рисунок 3. Структурная форма солюбилизатора Soluplus®

- универсальный привод Erweka AR 403 с насадкой YB-5 (Erweka Gmbh, Германия);
- сушилка-гранулятор псевдоожиженного слоя Solidlab 1 (Bosch Gmbh, Германия).

Универсальный привод Erweka AR 403 с насадкой YB-5

Тест «Растворение» проводили на аппарате Erweka DT 820 (Erweka Gmbh, Германия), тип аппарата II, при 75 оборотах в минуту. Средой растворения объемом 900 мл служил 0,05 М фосфатный буферный раствор с pH 3,0, содержащий 2,0% Tween® 20 [17]. Отбор проб проводили через 10, 20, 30, 45 минут, отбирали аликвотную часть объемом 5 мл и восполняли среду растворения таким же объемом. Пробу фильтровали через сито из полиэтилена с порами 0,45 мкм. Количество перешедшего в раствор дарунавира определяли в сравнении со стандартным образцом порошка дарунавира этанолата для ВЭЖХ с чистотой выше 98,0% из каталога Sigma-Aldrich (каталожный номер SML0937 Sigma) методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies, США), снабженном колонкой Enable C18 (250×4.6 мм, с диаметром частиц 5 мкм), в соответствии с методикой [18].

Erweka DT 820

В работе использовали реактивы квалификации «ч.д.а.» и «для ВЭЖХ».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обоснование состава и получение лекарственной формы

В настоящее время на фармацевтическом рынке присутствует твердая пероральная лекарственная форма дарунавира – таблетки, покрытые пленочной оболочкой, с оригинальным названием «Презиста», содержащие фармацевтическую субстанцию дарунавира этанолат в дозировках, эквивалентных дарунавиру: 75, 150, 400, 600 и 800 мг.

В настоящей работе в качестве лекарственной формы выбраны капсулы, при получении которых в отличие от таблеток компоненты не подвергаются высокому давлению сжатия, способному привести к ухудшению высвобождения труднорастворимой субстанции [19]. Для минимизации влияния вспомогательных веществ на качество лекарственной формы составы опытных образцов капсул были максимально приближены к составу таблеток «Презиста»: содержимое капсул образца 1 идентично составу ядра таблеток, в составы образцов 2 и 3 дополнительно включали солюбилизатор Soluplus® в количестве 1% и 5% от веса дарунавира. Теоретические составы содержимого капсул приведены в таблице 1.

Процесс гранулирования и сушки субстанции дарунавира проводили в аппарате с псевдоожиженным слоем при следующих условиях: объем входящего воздуха – 10 м^3/ч, температура входящего воздуха – 70 °С, скорость подачи 5% раствора солюбилизатора –

4 г/мин. Сушку гранулята проводили при тех же условиях до влажности продукта не более 1%. Полученный гранулят просеивали через сито с отверстиями 0,8 мм и смешивали с остальными компонентами с помощью универсального привода AR 403 с насадкой YB-5 (Erweka Gmbh, Германия), после чего снова просеивали. Полученную порошковую смесь опудривали магния стеаратом, предварительно просеянным через сито с отверстиями 0,315 мм, и дозировали в капсулы.

Таблица 1.

Теоретические составы опытных образцов капсул с дарунавира этанолатом

Наименование компонента лекарственной формы	Номер состава, количество, мг		
	1*	2	3
Дарунавира этанолат	433,64	433,64	433,64
Солюбилизатор (Soluplus®)	-	4,30	21,65
Si-МКЦ	369,53	123,36	107,36
Кросповидон	16,67	30,00	30,00
Диоксид кремния	7,59	3,00	3,00
Магния стеарат	6,17	6,00	6,00
Средняя масса, мг	833,60	600,00	600,00

Примечание: * – Идентичен составу ядра таблеток «Презиста», которые дополнительно покрыты пленочной оболочкой следующего состава: опадрай II светло-оранжевый 85F93377 (поливиниловый спирт частично гидролизованный, макрогол 3350, титана диоксид, тальк, алюминиевый лак на основе красителя «солнечный закат» желтый) [20].

Исследование капсул с дарунавира этанолатом

На рисунке 4 графически изображены профили высвобождения из испытуемых образцов капсулированной формы в сравнении с результатами высвобождения из таблеток «Презиста, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг».

Из данных рисунка видно, что все изученные лекарственные формы соответствуют фармакопейным требованиям, однако профили растворения у них несколько различаются.

Образцы 1 (капсулы без солюбилизатора), 2 (капсулы, содержащие 1% солюбилизатора) и препарат сравнения показали близкие результаты: за 10 минут в среду растворения из них перешло 50,3±2,1 и 61,8±3,2% (капсулы, образец 1 и 2 соответственно) и 60±3,4% субстанции (препарат сравнения). К 45 минутам этот показатель составил 87,7±2,4 и 98,6±3,1% соответственно и 98±3,1% (у оригинального продукта). Очевидно, что солюбилизатор, введенный в образец 2 в концентрации 1%, не оказывает существенного влияния на растворение фармацевтической субстанции. На основании расчета факторов сходимости [21] установлено, что образцы 1 (f_2 равен 42,04) и 2 (f_2 равен 46,14) нельзя считать эквивалентными образцу сравнения. Однако увеличение значения показателя для образца 2 демонстрирует небольшое преимущество последнего, возможно, за счет включения в состав солюбилизатора.

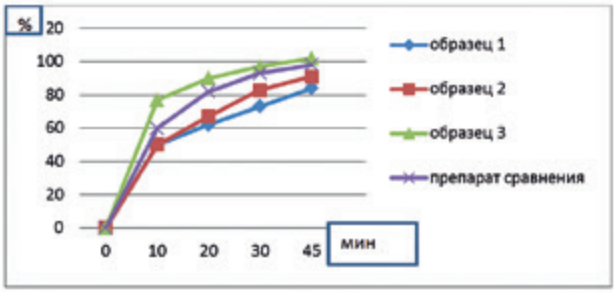


Рисунок 4. Профили высвобождения дарунавира из капсул (образцы 1–3) и препарата сравнения (средние значения, полученные из трех повторностей)

Сравнительный анализ результатов высвобождения из образца 3 (капсулы, содержащие 5% солюбилизатора) с показателями препарата сравнения показал преимущество капсульной формы: к 10 мин из нее высвободилось 72,9±2,4% субстанции, к 45 минуте эта цифра составила 103,2±3,1%. Фактор сходимости для образца 3 составил 56,04, что указывает на эквивалентность его профиля растворения аналогичному показателю образца сравнения.

Установленные различия могут быть связаны не только с наличием в лекарственной форме солюбилизатора в эффективной концентрации. Возможно, они обусловлены характеристиками субстанций различных производителей: размером частиц, морфологией кристаллов, полиморфизмом и другими физико-химическими характеристиками. Поэтому всестороннее изучение свойств субстанции является актуальной и первостепенной задачей разработки инновационных лекарственных форм дарунавира этанолата.

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение в лекарственную форму вспомогательного вещества Soluplus® в количестве 5% способствует интенсификации растворения дарунавира этанолата. Известно, что затрудненный переход лекарственного вещества в раствор может вызвать отсутствие корреляции дозы и фармакологического эффекта, низкую биодоступность, и, как следствие, снижение или из-

вращение фармакологического эффекта. Увеличение доли растворившегося лекарственного вещества способно привести к повышению биодоступности фармацевтических субстанций II класса БКС, к которому относится дарунавира этанолат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получена капсульная форма дарунавира этанолата, в результате изучения которой установлено, что солюбилизатор Soluplus®, включенный в ее состав, с увеличением концентрации оказывает положительное влияние на динамику высвобождения субстанции. Результаты исследований показали необходимость комплексного изучения физико-химических характеристик субстанции дарунавира этанолата и могут быть использованы при разработке лекарственной формы инновационного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Михайловина. Сколько в России ВИЧ-инфицированных. URL: http://www.the-village.ru/village/city/situation/214617-vich-infektsiya (дата обращения 09.06.2015).
2. Что такое ВИЧ. URL: http://www.spid.ru/spid/ru/what_is_aids (дата обращения 09.06.2015).
3. Вирус иммунодефицита человека. URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81_%D0%B8%D0%BC%D0%BC%D1%83%D0%BD%D0%BE%D0%B4%D0%B5%D1%84%D0%B8%D1%86%D0%B8%D1%82%D0%B0_%D1%87%D0%B5%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B5%D0%BA%D0%B0 (дата обращения 11.06.2015).
4. ВОЗ. ВИЧ/СПИД. Информационный бюллетень № 360. Июль 2016 г. URL: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/ru/ (дата обращения 11.06.2015).
5. ВОЗ. ВИЧ/СПИД. Антиретровирусная терапия для лечения и профилактики ВИЧ. URL: http://www.who.int/hiv/topics/treatment/ru/ (дата обращения 11.06.2015).
6. WHO Model List of Essential Medicines. URL: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/ (дата обращения 23.08.2015).
7. J. Chaves Ruela Correa, D.M. D'Arcy, C.H. dos Reis, S.H.R. Nunes Salgado. Darunavir: A Critical Review of Its Properties, Use and Drug Interactions // Pharmacology. 2012. № 90. P. 102–109.
8. Q8 Pharmaceutical Development. URL: http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/pharmaceutical-development.html (дата обращения 24.06.2015).
9. M.E. Aulton, K.M.G. Teylor. Aulton's Pharmaceutics: the Design and Manufacturing of Medicines / Churchill Livingstone Elsevier. 4th ed. – London. 2007. 717 p.
10. G.S. Banker, C.T. Rhodes. Modern Pharmaceutics / by Taylor & Francis Group. – New York, Basel: Marcel Dekker. 2002. 825 p.
11. C.H. Hsu, Z. Cui, R.J. Mumper, M. Jay. Micellar solubilization of some poorly soluble antidiabetic drugs // American Association of Pharmaceutical Scientists. 2008. № 9(2). P. 939–943.
12. Ф. Бюлер. Коллидон®. Поливинилпирролидон для фармацевтической промышленности: пер. с англ. 6 изд. – Б.м.: BASF. 2001. 310 с.
13. T. Reintjes. Solubility Enhancement with Basf Pharma Polymers / Basf SE. –Lampertheim: Pharma Ingredients & Services. 2011. 69 p.
14. Н.Б. Демина, А. Надер, М.Н. Анурова, В.В. Смирнов, А.И. Бардаков, И.И. Краснюк. Высвобождение биологически активных веществ экстракта имбиря из капсул // Фармация. 2016. Т. 65. № 4. С. 42-44.
15. Н.Б. Демина, М.Н. Анурова, Н. Алаа, В.В. Смирнов, А.И. Бардаков. Влияние вспомогательных веществ на растворимость сухого экстракта имбиря // Медицинский вестник Башкортостана. 2015. № 4. С. 42–43.
16. M. Linn. In vitro characterization of the novel solubility enhancing excipient Soluplus®: dissertation Ph. Doctor. – Saarbrucken, Universitat des Saarlandes. 2011. 133 p.
17. Handbook of Bioequivalence Testing / CRS Press. – Chicago: Taylor & Francis Group. 2015. 838 p.
18. K.J. Hemant, U.S. Jadhav. Development and validation of RP HPLC method for estimation of darunavir ethanolate in bulk and tablets // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015. V. 7(10). P. 386–389.
19. Н.Б. Демина, М.С. Демин. Разработка технологии производства капсульных форм лекарственных препаратов // Фармацевтическая разработка. Концепция и практические рекомендации. – М.: Перо. 2015. С. 196–236.
20. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения «Презиста, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг». URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=8db9f893-8334-4fe2-a19a-153435bbc974&t= (дата обращения 25.07.2015).
21. Методические указания Минздравсоцразвития России «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств», приложение 4. – М., 2008.

ГК "ФАРМКОНТРАКТ" –
ЭКСКЛЮЗИВНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР КОРЕЙСКОЙ КОМПАНИИ **SEJONG PHARMATECH** В РОССИИ

SEJONG PHARMATECH

Сушилка
в псевдосжиженном слое

D5Lm

- Функции установки D5L
- Производительность 1, 3, 5 л
- Экономичная технологическая линия

Высокоскоростной миксер

SM5C

- Смешивание, микрогранулирование, гранулирование
- Сменные емкости 1, 3 и 5 л

Установка псевдоожиженного
слоя сушки-грануляции

D5L

- Система быстрого сброса давления с пределом 12 бар
- Производительность 1 ~ 5 л
- Возможность реализации процессов нижнего и верхнего распыления

Optimized Technology
VANTIX

Лабораторная серия оборудования для таблетирования, капсулирования, сушки и грануляции

стр. 269

Таблеточные прессы серии P

P130S

- Система HMI, ПО отвечает требованиям FDA и 21CFR часть 11
- Комбинированный ротор B/D
- Система автоматического регулирования веса таблеток

Коатер серии C

C30FC

- Сменные полностью перфорированные драже-ровочные котлы
- Настройка распылительного пистолета
- Производительность 0,4 ~ 6,3 кг

Установка псевдоожиженного
слоя сушки-грануляции

C30JC

- HEPA-фильтр для выбрасываемого воздуха
- Система CIP
- Автоматическая выгрузка таблеток
- Производительность 0,4 ~ 6,3 кг

Pharmcontract
group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com

УДК 615.2/.3.012, 543.42+543.54

1 – ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, Россия, г. Москва, Каширское ш., 24

1 – Federal State Budgetary Scientific Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», 24, Kashirskoye highway, Moscow, 115478, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: ilya.gulyakin@yandex.ru
Тел.: 8 (499) 324 14 54

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЛХС-1208 МЕТОДАМИ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

И.Д. Гулякин[1]*, Л.Л. Николаева[1], М.В. Дмитриева[1], О.Л. Орлова[1], А.П. Полозкова[1], Н.А. Оборотова[1], Е.В. Игнатьева[1], Н.А. Дмитричева[1], И.В. Ярцева[1], З.С. Шпрах[1]

Резюме. Работа посвящена разработке технологии получения лиофилизированной лекарственной формы ЛХС-1208 и созданию методов контроля качества лекарственного препарата. Авторами приведены методики спектрофотометрического анализа и тонкослойной хроматографии.

Ключевые слова: ЛХС-1208, лиофилизированная лекарственная форма, сублимационная сушка, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография.

PREPARATION AND ANALYSIS OF LYOPHILIZED DOSAGE FORM LHS-1208 BY THIN CHROMATOGRAPHY AND A SPECTROPHOTOMETERY

I.D. Gulyakin[1]*, L.L. Nikolaeva[1], M.V. Dmitrieva[1], O.L. Orlova[1], A.P. Polozkova[1], N.A. Oborotova[1], E.V. Ignatieva[1], N.A. Dmitricheva[1], I.V. Yartseva[1], Z.S. Shprakh[1]

Abstract. The work is dedicated to the development of technology for obtaining a freeze-dried dosage form LHS-1208 and the establishment of methods of quality control of the drug. The authors have shown spectrophotometric analysis techniques and flash chromatography.

Keywords: LHS-1208, lyophilized dosage form, freeze drying, spectrophotometry, thin layer chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

Создание высокоэффективных оригинальных отечественных противоопухолевых препаратов, избирательно разрушающих опухолевую ткань, является одним из актуальных направлений современной российской науки, решающей задачу снижения смертности населения и увеличения продолжительности жизни. Среди широкого спектра многообещающих групп лекарственных препаратов особый интерес представляют N-гликозиды замещенных индоло[2,3-a]карбазолов и родственные соединения, способные инициировать пути гибели опухолевых клеток путем ингибирования нескольких типов мишеней [1].

В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана лиофилизированная лекарственная форма (ЛИО-ЛФ) препарата из группы индолокарбазола ЛХС-1208 «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 9 мг» [2]. Обладая высокой противоопухолевым эффектом по отношению к опухолям различного гистогенеза, данный лекарственный препарат проявляет сильную ингибирующую активность в отношении киназ – циклинзависимой киназы (Cdk1), протеинкиназы С и тирозинкиназы; второй мишенью является двухцепочечная ДНК и комплекс ДНК с топоизомеразой [3–7].

Цель исследования – обоснование технологии получения ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 и разработка методик качественного и количественного определения действующего вещества в ЛИО-ЛФ методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и спектрофотометрии (СФМ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы

Субстанция ЛХС-1208 (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); Cremophor ELP (BASF, Германия), Kollisolv

PEG-400 / Lutrol E-400 (BASF, Германия), Kolliphor HS15 (BASF, Германия), Kollidon 17 PF (BASF, Германия), вода очищенная (ФС 42-2619-97), диметилсульфоксид – ДМСО (ч.д.а., «Химмед», Россия), диметилформамид – ДМФА (ч.д.а., «Химмед», Россия), бензол (ч.д.а., «Химмед», Россия), спирт этиловый 95%-й (ФС.2.1.0036.15, «РосБио», Россия).

Приборы и аппаратура

Весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия); весы лабораторные Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия); фильтрационная система Stericup GP Millipore Express Plus (Merck Millipore, США); сублимационная сушка Minifast DO.2 (Edwards, Великобритания); сублимационная сушка Minifast 10 (BOC Edwards Tianli pharmaceutical system, Китай); полуавтомат ПЗР-34-ВИПС-МЕД для укупорки флаконов колпачками К-2-20 и К-3-34 (ООО «Фирма «ВИПС-МЕД», Россия); pH-метр HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия); спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия); хроматографические пластинки Sorbfil

Фильтрационная система Stericup GP Millipore Express Plus

Спектрофотометр Agilent Cary 100

УФ-254 («Сорбфил», Россия); кюветы с крышкой для спектрофотометрии и стеклянные хроматографические камеры.

Методика количественного определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ методом СФМ

Оптическую плотность анализируемых растворов измеряли при длине волны 320±2 нм с использованием в качестве раствора сравнения ДМФА. Концентрация исследуемых растворов ЛХС-1208 в ДМФА подобрана таким образом, чтобы оптическая плотность находилась в области значения 0,5 [8]. При этом количественное определение ЛХС-1208 проводили при его концентрации в растворе около 3 мг/мл.

Для приготовления испытуемого раствора содержимое одного флакона растворяли в небольшом количестве ДМФА, переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки ДМФА. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки тем же растворителем. В качестве стандартного образца (СО) использовали раствор субстанции ЛХС-1208 в ДМФА в соответствующей концентрации. Измерение оптической плотности испытуемого раствора проводили па-

Весы лабораторные Sartorius LA 1200 S

раллельно с измерением оптической плотности СО относительно ДМФА в максимуме при длине волны 320±2 нм.

Содержание ЛХС-1208 во флаконе (X, мг) рассчитывали по формуле:

$$X= D1\times a_0\times P/ D_0\times 100,$$

где D и D_0 – соответственно оптические плотности растворов образца ЛИО-ЛФ и СО ЛХС-1208; a_0 – навеска СО ЛХС-1208 в мг; P – содержание ЛХС-1208 в СО в процентах.

Методика определения качественного состава ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 методом ТСХ

Используют хроматографическую пластинку Sorbfil УФ-254 размером 150×100 мм. На нее карандашом наносят линию старта (1 см от нижнего края) и линию финиша (2 см от верхнего края). На линию старта наносят отметки карандашом: 1 – СОВС-1; 2 – СОВС-2; 3 – исследуемый образец. Готовят растворы СОВС-1; СОВС-2; исследуемого образца (при этом отступают от краев пластинки не менее чем на 1 см):

Приготовление СОВС-1: 2 мг субстанции ЛХС-1208 растворяют в 1 мл ДМСО. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление СОВС-2: 133 мг Kollidon 17PF растворяют в 1 мл ДМСО. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора исследуемого образца: содержимое одного флакона растворяют в 9 мл ДМСО. Раствор используют свежеприготовленным.

На линию старта хроматографической пластинки в соответствии с разметкой наносят по 5 мкл растворов СОВС-1 (10 мкг субстанции ЛХС-1208); СОВС-2 (665 мкг Kollidon 17PF); исследуемого образца (10 мкг субстанции ЛХС-1208, 665 мкг Kollidon 17PF) автоматической пипеткой. Пластинку с нанесенными пробами подсушивают на воздухе в течение 30 мин. Предварительно готовят хроматографическую камеру, при этом в нее наливают отмеренные количества растворителей и по бокам размещают полоски фильтровальной бумаги, накрывают стеклом и оставляют насыщаться в течение 1 ч [9].

В насыщенную парами растворителей камеру помещают высушенную пластинку с нанесенными образцами и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом растворителей финиша пластинку вынимают, подсушивают на воздухе до полного исчезновения запаха растворителей, очерчивают видимые пятна карандашом, потом проявляют Kollidon 17PF с помощью раствора Люголя, снова подсушивают на воздухе до полного исчезновения запаха растворителей, затем с помощью линейки находят середину пятна, замеряют расстояние от старта до середины пятна, а также длину и ширину пятна, отмечают форму пятна.

Проявившиеся пятна в образцах идентифицировали относительно пятен веществ-свидетелей и характеризовали по величине удерживания R_f, рассчитываемой по формуле:

$$R_f=L_в/L_ф,$$

где $L_в$ – расстояние от линии старта до центра хроматографической зоны исследуемого вещества, мм; $L_ф$ – расстояние от линии старта до линии финиша элюента, мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка технологии получения ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 началась с изучения растворимости субстанции ЛХС-1208 с использованием различных солюбилизаторов (Cremophor ELP, Kollisolv PEG-400/Lutrol E-400, Kolliphor HS15, Kollidon 17 PF). Показано, что полное растворение субстанции без добавления органического растворителя наблюдается только при применении Kollisolv PEG-400 / Lutrol E-400, которые пригодны только для местного и перорального применения. Однако при оценке эффективности модельной пероральной ЛФ с Kollisolv PEG-400 / Lutrol E-400 не выявлено значимого терапевтического эффекта (ТРО составило 10–20%).

В связи с невозможностью растворения субстанции ЛХС-1208 с использованием только сорастворителей и хорошей растворимости ее в ДМСО определили максимально возможную концентрацию ЛХС-1208 в данном органическом растворителе. Она составила порядка 7%, что позволило вводить в состав ЛФ минимальное количество ДМСО (~5%).

Подобраны составы модельных лекарственных форм ЛХС-1208 с использованием таких солюбилизаторов, как Cremophor ELP, Kolliphor HS15, Kollidon 17PF, обеспечивающие концентрацию действующего вещества 0,2–0,3% и стабильные в растворе в течение 1 суток. Однако при исследовании состава, содержащего Kolliphor HS15, на интактных мышах выявлена высокая токсичность данного солюбилизатора, что заставило отказаться от его применения.

Изучена стабильность выбранных модельных лекарственных форм ЛХС-1208 с Cremophor ELP и Kollidon 17PF в процессе хранения в холодильнике (температура 4±2 °С) в течение 1 суток. В качестве контрольных точек выбрали время сразу после приготовления, через 1 и 3 ч, через 1 сутки. Оценку стабильности проводили по параметрам: внешний вид раствора, значение pH, содержание ЛХС-1208 в % от теоретического.

При оценке результатов изучения стабильности двух модельных ЛФ оказалось, что ЛФ, содержащая в своем составе Kollidon 17PF, стабильна по указанным выше параметрам в течение 7 суток. В то время как ЛФ, содержащая в качестве солюбилизатора Cremophor ELP, хотя и сохраняет надлежащий внешний вид на протяжении 1 мес. и более, но при этом концентрация действующего вещества в данной ЛФ через 7 суток снижается на 10% от теоретического. Полученные данные указывают на необходимость совершенствования состава ЛФ, содержащей Cremophor ELP (добавление стабилизаторов и т.д.). Модель ЛФ с Kollidon 17PF (содержание ЛХС-1208 3 мг/мл) по физико-химическим параметрам отобрана для проведения дальнейших исследований, для увеличения срока хранения предложено использовать лиофилизацию.

Для замораживания использовали раствор модельной ЛФ ЛХС-1208, которую дозировали по 6 мл во флаконы вместимостью 30 мл, толщина слоя составляет 15 мм. Модели ЛФ ЛХС-1208 замораживали на полке сублимационной установки (начальная температура +20…+22 °С) до температуры –40…–45 °С. При достижении заданной температуры на препарате выдерживали в течение 3 ч, далее включали нагрев до температуры +20…+22 °С.

При оттаивании наблюдалось расслоение замороженной таблетки модельной ЛФ ЛХС-1208. При достижении температуры от –30 °С до –25 °С в нижнем слое таблетки образовывался раствор ярко-желтого цвета. Остальная таблетка размораживалась при температуре от –10 °С до –8 °С (рисунок 1).

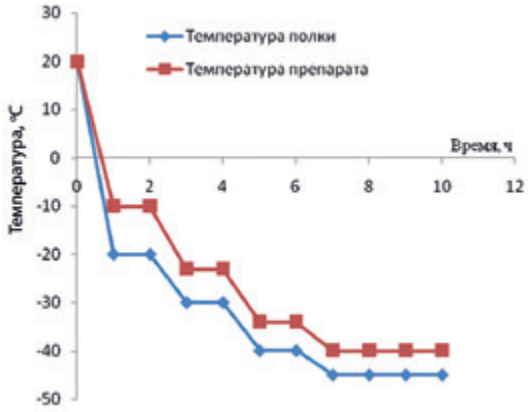


Рисунок 1. **Замораживание модельной ЛФ ЛХС-1208**

На продолжительность сушки оказывала влияние толщина слоя исходного раствора, а также время и температура досушивания препарата. При интенсификации процесса сушки путем увеличения скорости подъема температуры до +10 °С в час и повышения температуры при досушивании до +27 °С наблюдалось снижение содержания ЛХС-1208 во флаконе ниже допустимых пределов. Снижение интенсивности подогрева до 5 °С в час и увеличение времени досушивания до 13–15 ч при +18…+20 °С также не обеспечивало гарантированного качества продукта. На основании экспериментальных сушек был выбран следующий режим лиофилизации.

Раствор ЛХС-1208 3 мг/мл стерилизовали фильтрацией через с полиэфирсульфоновые фильтры Millipore, имеющие размер пор 0,22 мкм. Стерильный раствор дозировали по 3 мл во флаконы объемом 20 мл и помещали на полки сублимационной сушки. Кассеты с флаконами помещали на полку сублимационной установки, подключали датчики, установленные во флаконы, закрывали камеру сублимационной установки и начинали замораживание продукта. Замораживание проводили при температуре –40…–45 °С. После достижения заданной температуры препарат выдерживали в течение 2,5–3,5 ч. Контролировали температуру и продолжительность замораживания по регистрирующему устройству.

Далее включали вакуумный насос. После включения вакуумного насоса и выравнивания вакуума выдерживали около 3 ч и начинали нагрев полок. Максимально возможная скорость подъема температуры – 2 °С/ч. Через 1 ч после достижения температуры полок +20 °С включали инжекцию воздуха и доводили остаточное давление в камере до значения 40–50 Па. Температура препарата при досушивании не должна превышать +20 °С. Продолжительность досушивания – от 2 до 3 ч. Общее время сушки препарата во флаконах вместимостью 30 мл составляет 35–48 часов (рисунок 2).

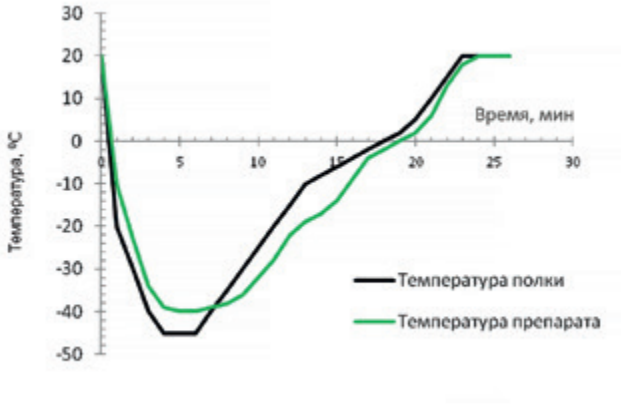


Рисунок 2. **График сублимационной сушки ЛИО-ЛФ ЛХС-1208**

По окончании сушки вакуум в сублимационной камере гасили чистым, профильтрованным воздухом, который поступает в камеру через систему фильтров. Кассеты с препаратом выгружали из сублимационной камеры, закрывали крышками и передавали на укупорку. Качество готового продукта оценивали по следующим критериям: внешний вид препарата (цвет,

пористость, однородность), растворимость, прозрачность, значение pH, потеря в массе при высушивании, содержание препарата во флаконе.

Разработку методики количественного определения действующего вещества в ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 начали с изучения электронного спектра поглощения (ЭСП). Данная субстанция практически нерастворима в воде, измерения проводили для растворов ЛХС-1208 в ДМФА, которые имеют характерные ЭСП: в области 200–500 нм наблюдаются максимум поглощения при 287±2 нм, плечо при 306±2; максимум поглощения при 320±2 нм, плечо при 343±2 нм, слабо интенсивный максимум при 420 нм (рисунок 3). Отношение значений оптической плотности в максимумах D320/D287 составляет 1,42±0,05. В максимуме при λ_{max}=320 нм наблюдается более интенсивное поглощение, поэтому он был выбран в качестве аналитического сигнала. Для снижения систематических и случайных ошибок при определении ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ в методику спектрофотометрического анализа ввели способ расчета по СО. В качестве СО использовали субстанцию ЛХС-1208.

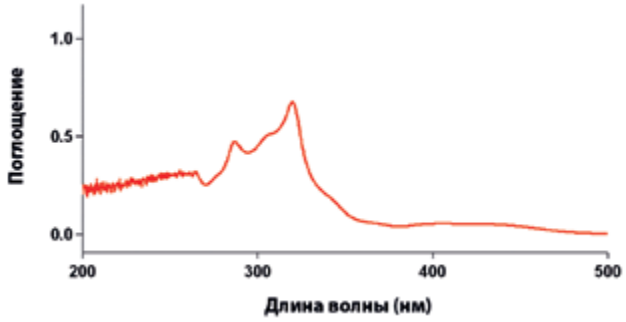


Рисунок 3. Электронный спектр поглощения субстанции ЛХС-1208 (0,0006% раствор в ДМФА)

Рабочей концентрацией раствора ЛХС-1208 выбрали концентрацию 0,006–0,008 мг/мл; при этом величина оптической плотности укладывается в интервал, рекомендуемый ГФ XIII, а максимумы поглощения в растворах субстанции и ЛФ совпадают (рисунок 4).

Поглощение раствора ЛХС-1208 подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бера: линейная зависимость значения оптической плотности от концентрации ЛХС-1208 наблюдается в интервале концентраций от 0,003 мг/мл до 0,010 мг/мл. Ошибку метода СФМ оценивали путем проведения анализа 6 флаконов. Статистические характеристики спектрофотометрического определения содержания ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ представлены в таблице 1. Ошибка единичного определения составляет 0,40%, что указывает на возможность точного определения содержания действующего вещества в ЛИО-ЛФ.

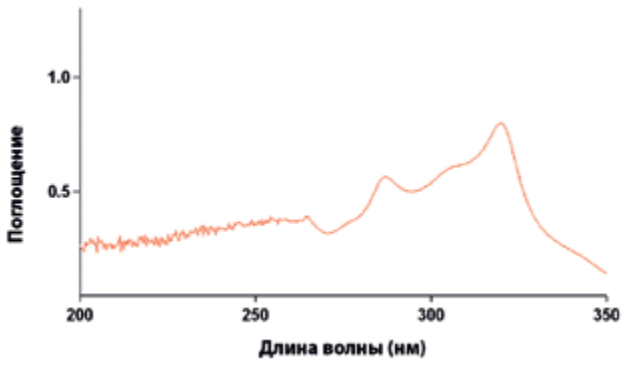


Рисунок 4. Электронный спектр поглощения раствора ЛИО-ЛФ ЛХС-1208

Таблица 1.

Результаты количественного определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ

№ образца ЛИО-ЛФ ЛХС-1208	Оптическая плотность	Содержание ЛХС-1208 в образце ЛИО-ЛФ, мг/флакон
1	0,765	9,30
2	0,761	9,25
3	0,769	9,35
4	0,766	9,31
5	0,763	9,27
6	0,761	9,25
Статистические характеристики	n=6, f=5, $x_{ср}$=9,288, S^2=1,28×10^{-3}, S=3,58×10^{-2}, $Sx_{ср.}$=1,46×10^{-2}, t (P, f)=2,57 (P=95%), Δx=0,0375, ε=0,40%	

Качественное определение ЛХС-1208 проводили с использованием ТСХ. В результате проведенных исследований экспериментально была выбрана система бензол / спирт этиловый (1:1) (таблица 2). Присутствие значительного количества Kollidon 17 PF в ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 по сравнению с количеством основного вещества (133 мг и 2 мг соответственно) затрудняет разделение компонентов ЛФ, поэтому для более правильной идентификации активного вещества на пластины в качестве стандартных образцов веществ-свидетелей было предложено наносить пробы растворов в ДМСО субстанции ЛХС-1208 и ЛИО-ЛФ ЛХС-1208. При просмотре хроматограмм в УФ-свете растворов в ДМСО субстанции ЛХС-1208 и ЛИО-ЛФ ЛХС-1208, помимо пятна ЛХС-1208, наблюдалось хорошо очерченное пятно на старте, соответствующее Kollidon 17 PF. Только в двух системах удалось оторвать Kollidon 17 PF от стартовой линии: пропанол-2 / 25% аммиак (36:24) и этиловый спирт / 25% аммиак (50:20) (таблица 2).

Таблица 2.

Эффективность подвижной фазы при ТСХ-анализе ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 на хроматографических пластинках Sorbfil

Состав подвижной фазы, соотношение в мл	Время анализа, мин	Значение R_f			
		СОВС-1	СОВС-2	ЛЛФ ЛХС-1208	
				ЛХС-1208	Kollidon 17 PF
Бензол/этанол (30:30)	30	0,66	0	0,63	0
Бензол/ацетон (30:30)	40	–	0	–	0
Ацетон/этилацетат/ вода (40:16:4)	35	0,53	0	0,525	0
Хлороформ/этанол/ ЛУК (40:20:6)	105	0,75	–	0,73	–
Пропанол-2 / 25% аммиак (36:24)	180	0,74	0,63	0,68 (одно пятно)	
Пропанол-2 / 25% аммиак (50:5)	160	–	0	–	0
Пропанол-2 / 25% аммиак / ацетон (20:10:30)	105	0,58	–	0,59	–
Этилацетат / этанол / 25% аммиак (51:6:9)	50	0,36	0	0,35	0
Хлороформ/метанол (50:10)	90	0,77	0	0,76	0
Этанол / 25% аммиак (50:20)	290	–	0,69	–	0,69
Этанол	200	0,79	0	0,78	0
Н-гексан/бутанол (35:35)	180	0,33	0	0,32	0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработаны методики качественного ТСХ-анализа и количественного спектрофотометрического определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ, также обоснована технология ее получения. В результате серии экспериментов выбран оптимальный температурный режим лиофилизации разработанного состава (модель ЛФ с Kollidon 17PF в качестве солюбилизатора, содержание ЛХС-1208 3 мг/мл), который не требует предварительного замораживания, а также определен наиболее приемлемый объем заполнения флаконов – 3 мл. Подобрана система растворителей для определения действующего вещества – бензол / спирт этиловый (1:1).

При изучении абсорбционных характеристик ЛХС-1208 выявлено, что спектр поглощения раствора ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 идентичен спектру поглощения субстанции ЛХС-1208 по положению максимумов и форме кривой. Установлено, что вспомогательные вещества, входящие в состав ЛИО-ЛФ, и ДМФА, используемый в качестве раствора сравнения, практически не поглощают излучение в области максимумов поглощения ЛХС-1208. В качестве рабочей длины волны для анализа ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ выбрана полоса поглощения средней интенсивности с максимумом 320 нм.

Поглощение раствора ЛХС-1208 подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бера: линейная зависимость значения оптической плотности от концентрации ЛХС-1208 наблюдается в интервале концентраций от 0,003 мг/мл до 0,010 мг/мл. Ошибка спектрофотометрического определения концентрации ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ составила 0,40%.

ЛИТЕРАТУРА

1. М.П. Киселева, З.С. Смирнова, Л.М. Борисова и др. Поиск новых противоопухолевых соединений среди производных N-гликозидов индоло[2,3-а] карбазолов // Российский онкологический журнал. 2015. № 1. С. 33–37.
2. А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, Н.А. Оборотова и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола ЛХС-1208 // Российский биотерапевтический журнал. 2014. Т. 13. № 3. С. 25–32.
3. З.С. Смирнова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева и др. Противоопухолевая активность соединения ЛХС-1208 (N-гликозилированные производные индоло[2,3-а]карбазола) // Российский биотерапевтический журнал 2010. № 1. С. 80.
4. З.С. Смирнова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева и др. Противоопухолевая эффективность прототипа лекарственной формы соединения ЛХС-1208 для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. 2012. № 2. С. 49.
5. З.С. Смирнова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного индолокарбазола ЛХС-1208 // Российский биотерапевтический журнал. 2014. № 1. С. 129.
6. М.П. Киселева, З.С. Шпрах, Л.М. Борисова и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение I // Российский биотерапевтический журнал. 2015. № 2. С. 71–77.
7. М.П. Киселева, З.С. Шпрах, Л.М. Борисова и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение II// Российский биотерапевтический журнал. 2015. № 3. С. 41–47.
8. ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях // Государственная фармакопея, XIII изд.
9. ОФС.1.2.1.2.0003.15 Тонкослойная хроматография // Государственная фармакопея, XIII изд.

УДК 615.371

ВАКЦИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАРКОТИКОВ

В.С. Морозова[1]*, М.А. Мягкова[1], В.В. Суслов[2,3], С.А. Кедик[2,3]

1 – ФГБУ Институт физиологически активных веществ РАН, 142432, Россия, Московская обл., г. Черноголовка, Северный пр., 1

2 – ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, 21/32, стр. 1

3 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (ИТХТ), 119571, Россия г. Москва, Проспект Вернадского, 86

1 – Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, 1, Severnyi proyezd, Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia

2 – ZAO «Institute of Pharmaceutical Technologies», 21/32, Skolkovskoe shosse, Moscow, 121353, Russia

3 – Moscow Technological University (ITHT), 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: vmorozova@gmail.com
Тел.: 8 (495) 673 39 42

Резюме. Современные лекарственные препараты для лечения наркотической зависимости являются малоэффективными. В последнее десятилетие различными научными школами по всему миру разрабатывается новый подход – терапевтические вакцины для противорецидивного лечения наркомании. Введение вакцины вызывает выработку специфических антител, которые связывают наркотик при его попадании в организм и значительно уменьшают его концентрацию в мозге. В обзоре описаны основные подходы к созданию антинаркотических вакцин, их составы, проблемы, с которыми сталкиваются исследователи при их разработке.

Ключевые слова: наркомания, наркозависимость, вакцина, иммуноген, опиаты, противорецидивное лечение.

VACCINE FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF DRUG ADDICTION

V.S. Morozova[1]*, M.A. Myagkova[1], V.V. Suslov[2,3], S.A. Kedik[2,3]

Abstract. Medicines used for the treatment of drug addiction nowadays are ineffective. In the last decade, various schools around the world are developing a new approach: the therapeutic vaccine for the treatment of drug addiction. The vaccine injection raises the production of specific antibodies that bind to the drug when it is used and substantially reduces its concentration in the brain. The review describes the main approaches to the design of anti-drug vaccines, their composition, the problems faced by researchers in their development.

Keywords: addiction, drug addiction, the vaccine immunogen, opiates, anti-treatment.

ВВЕДЕНИЕ

Употребление наркотических средств ведет к разрушению личности, характеризуется высоким уровнем вовлечения окружающих в употребление и является значительным криминогенным фактором. Проблема большой распространенности заболевания наркотической зависимостью продолжает быть актуальной в России и во всем мире. По оценкам ВОЗ, количество людей, употребляющих наркотики, составляет во всем мире 210 млн чел. (или 3%) из 7 млрд населения планеты. В период с 2000 по 2012 г. в России резко возросло количество человек, которые регулярно или периодически употребляют наркотические вещества, – от 2 млн до 8 млн чел. [1, 2]. По данным ФСКН, в России ежегодно от наркотиков умирают 70 тыс. молодых людей, а число героиновых наркоманов достигло почти 1,5 млн. Регулярно или эпизодически употребляют наркотики 8 млн чел., хотя бы раз в жизни наркотики пробовали 12,5% российских граждан – почти 18,5 млн чел. [3].

Лишь небольшая часть этих людей попадает в статистику Минздрава РФ. В 2014 году специализированными учреждениями Минздрава России зарегистрировано 2 млн 766 тыс. лиц с наркологическими расстройствами (2% общей численности населения) [4]. С диагнозом наркомании зарегистрировано около 321,8 тыс. лиц, опиоидных наркоманов – 252,2 тыс. человек. Кроме того, 225,4 тыс. человек в 2014 г. были зарегистрированы с диагнозом «употребление наркотиков с вредными последствиями».

Структура зарегистрированных пациентов практически не изменяется в течение последних лет: подавляющее большинство составили больные с опийной зависимостью – 80%, второе ранговое место заняла группа пациентов, включающая больных полинаркоманией и зависимых от других наркотиков, – 8%; больные с зависимостью от каннабиса заняли третье ранговое место – 7%; на четвертом месте, как и в предыдущие годы, группа пациентов с зависимостью от психостимуляторов (амфетамины, кокаин и т.п.) – 2% [5].

Следует отметить, что это официальная статистика, отображающая число больных, обратившихся за помощью в госу-

дарственные наркологические учреждения. Однако стоит учесть, что большинство наркологических больных ищет помощи в коммерческих клиниках, некоммерческих и конфессиональных реабилитационных центрах, число которых растет из года в год [6].

Число негосударственных реабилитационных учреждений (коммерческих, некоммерческих, обществ само- и взаимопомощи) на сегодняшний день точно не установлено, но в общей сумме значительно превышает количество государственных. По данным специалистов Научного центра наркологии Минздрава, их более тысячи, причем основная часть приходится на конфессиональные учреждения [7]. По оценке врачей-наркологов, число наркоманов, больных опиоидной зависимостью, проходящих медикаментозное лечение в негосударственных медицинских учреждениях, превышает число пациентов, зарегистрированных и получающих лечение в государственных наркологических учреждениях. Количество пациентов этой группы в негосударственном секторе составляет порядка 300 тыс. человек.

Таким образом, общее число опийных наркоманов, обращающихся за лекарственной медицинской помощью, составляет порядка 550 тыс. человек. Еще около 300 тыс. пациентов лечатся методами психотерапии, «кодированием», в трудовых и религиозных реабилитационных центрах.

ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАРКОТИКОВ

Одним из главных факторов, способствующих распространению наркомании, является трудность ее излечивания. В первые два года после прохождения курса лечения крайне высок риск рецидивов заболевания. По данным исследований, в стойкую ремиссию входят лишь порядка 4–30% от общего числа заболевших опийной зависимостью [8]. Противорецидивное лечение наркомании в настоящее время проводится с помощью двух подходов:

1. Традиционный подход – лечение с использованием блокаторов опиатных рецепторов (налтрексона) при зависимости от препаратов группы опия. Данный подход является недостаточно эффективным в долгосрочной перспективе.
2. Заместительная терапия (бупренорфин, метадон). Данные препараты имеют много побочных эффектов, обладают высокой аддиктивностью и требуют длительного, порой пожизненного лечения.

   Заместительная терапия запрещена в России.

Новым трендом в данной отрасли является разработка вакцин против наркозависимости.

В соответствии с приказом Минздрава РФ от 08.06.2011 № 475 глобальной задачей является разработка новых подходов к иммунопрофилактике (вакцинации), таких как средства первичной профилактики и предупреждения дальнейших рецидивов при токсических отравлениях, включая развитие наркологических заболеваний, в частности опийной наркомании [9, 10].

Идея создания вакцин против наркомании и первые исследования на животных появились еще в 1970-х гг., однако затем все внимание исследователей было переключено на разработку препаратов – блокаторов опиатных рецепторов, а также метадона, так как эти подходы требовали гораздо меньше средств, исследований и представлялись более перспективными. В последние годы стала очевидной невысокая эффективность таких средств, и исследователи вернулись к разработке вакцин.

Вакцины против различных наркотических веществ разрабатываются разными научно-практическими центрами и биотехнологическими компаниями в США, Мексике, Китае, России. Американский National Institute on Drug Abuse (NIDA) финансирует разработку вакцины против героиновой, кокаиновой и метамфетаминовой зависимости, проводимую различными научными институтами США.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ВАКЦИНЫ

Введение вакцины формирует в организме пролонгированный иммунный ответ: образуются антитела, специфичные к определенному классу наркотиков. Действие антинаркотических вакцин происходит на периферическом уровне, в отличие от используемых противорецидивных препаратов. Крупная молекула иммуногена не проникает через гематоэнцефалический барьер, выработка и циркуляция антител также происходит на периферии. Молекулы наркотического вещества (героин, морфин) являются низкомолекулярными, поэтому легко проходят ГЭБ и действуют на рецепторы в головном мозге. При наличии в кровотоке специфических антител, выработанных под действием двух-, трехкратного введения вакцины, введенный наркотик связывается в иммунный комплекс, который не способен проникнуть через ГЭБ (либо количество попавшего в мозг наркотика значительно снижается), и наркотик не оказывает ожидаемого психоактивного и токсического эффекта. Такой эффект антинаркотических вакцин показан на животных [17, 26]. При применении у больных наркоманией пациент не получает удовольствия или облегчения от наркотической тяги и теряет мотивацию к последую-

щему приему наркотиков. Вакцина также выполняет антитоксическую функцию: предотвращает последствия передозировки наркотиков.

ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ИММУНОГЕНА ВАКЦИНЫ

В связи с тем, что наркотические вещества являются низкомолекулярными, в составе вакцин используют высокомолекулярные соединения – белки различной природы. В состав большинства разрабатываемых вакцин входит иммуноген, состоящий из аналога наркотического вещества (например, остатка морфина) и присоединенного к нему макромолекулярного носителя, многократно усиливающего иммуногенность препарата.

Низкомолекулярный фрагмент молекулы иммуногена, обеспечивающий специфичность выработки антител, называется гаптеном. Чаще всего гаптеном является само наркотическое вещество (например, морфин в антиопиатной вакцине), модифцифцированное небольшим фрагментом-спейсером для присоединения его к высокомолекулярному носителю. Подавляющим большинством создателей антинаркотических вакцин в качестве гаптена используется именно наркотическое вещество. Однако в этом случае возникают трудности, связанные с применением наркотиков в производстве лекарственных препаратов: фармкомпания должна иметь лицензию на работу с наркотическими веществами и их превращения и строго отчитываться об их обороте. К настоящему времени лишь один разработчик – Научно-исследовательский институт сухопутных войск им. Уолтера Рида (США) – предложил использование синтетических аналогов морфина, химически отличных от него, но полностью повторяющих его пространственную структуру [25]. Однако последние статьи этих исследователей посвящены все-таки вакцинам с морфиновыми конъюгатами из-за их большей эффективности [16]. Тем не менее нам представляется весьма перспективным применение пространственно подобных наркотическим веществам структур, способных связываться с соответствующими рецепторами и вызывать выработку антител, специфичных к наркотическим веществам. Подобные исследования требуют детальной проработки как соответствия выбранных структур центрам связывания в рецепторах, так и способности вызывать выработку антител с заданной специфичностью.

В качестве макромолекулярного носителя в большинстве работ используется гемоцианин моллюска (ГМ), так как это крупный белок (918 кДа), обеспечивающий хороший иммунный ответ [11–15]. Однако все разработчики вакцин с ГМ столкнулись с практической трудностью использования этого белка: он является чужеродным и не разрешен для введения человеку, поэтому необходима дополнительная процедура изучения безопасности этого белка. Кроме того, ГМ является плохо растворимым белком, структура полученных иммуногенов плохо воспроизводится, что является дополнительным препятствием при разработке технологии производства препарата. В результате большинство разработок с ГМ приостановлены и многие разработчики заявили о необходимости использования других белковых носителей, например белков токсинов.

Белки токсинов (токсин столбняка, холерный токсин) обладают хорошей иммуногенностью и разрешены для введения человеку, так как используются в составе соответствующих вакцин [16, 17]. По тем же причинам разработчики антикокаиновой вакцины используют капсидный белок аденовируса серотипа 5 в качестве макромолекулярного носителя [18].

Чужеродные иммуногенные белки обеспечивают продолжительный иммунный ответ, однако возрастает вероятность побочных эффектов (аллергических реакций, индивидуальной непереносимости). Некоторые исследователи для решения этой проблемы, а также для упрощения процедуры подтверждения безопасности препарата предлагают использование человеческих белков вместо чужеродных [19, 20]. Однако человеческие белки имеют слабую иммуногенность у людей и не обеспечивают стойкого иммунного ответа. Поэтому разработчики анти-кокаиновой вакцины [19] переключились с человеческих белков на белок аденовируса, а российские ученые применили альтернативный подход: присоединили к конъюгату «наркотическое вещество – человеческий белок» иммунокомпетентный полимер полиоксидоний [20].

Наиболее распространенным способом усиления иммуногенности вакцины является, как известно, введение адъюванта. Некоторые создатели вакцин против наркозависимости также используют различные виды адъювантов. Исследователи Национального института психиатрии Рамона де ла Фуэнте Мюница (Мексика) в антиопиатной вакцине применили гидроксид алюминия [17]. Однако классические адъюванты, в том числе широко используемый адъювант Фрейнда, имеют много побочных эффектов, поэтому в настоящее время все большее использование находят новые типы адъювантов. Так, в антиопиатной вакцине, разрабатываемой в Научно-исследовательском институте сухопутных войск им. Уолтера Рида (США), в качестве адъюванта используются липосомы с монофосфолипидом А [16]. Исследователи Уральского медицинского университета разработали вакцину, усиленную полиоксидонием. Синтетический иммуноген представляет собой конъюгат белка человеческого гамма-глобулина и наркотического или психотропного соединения, модифицированный полиэлектролитом – полиоксидо-

нием. Это соединение является иммуностимулятором, поэтому в составе вакцины выполняет две функции: укрупнителя и адъюванта.

В литературе встречаются и иные, отличные от описанных выше, подходы к созданию вакцин. Например, разрабатывается пассивная вакцина, то есть искусственно полученные антитела с известной аффинностью и специфичностью, направленной против определенной группы наркотиков. Антитела к наркотическим соединениям получают у животных, а затем преобразуют в форму, которая может быть введена человеку. Такие вакцины разрабатываются против зависимости от фенциклидина и метамфетамина [21]. Однако пассивные вакцины – гуманизированные моноклональные антитела – намного дороже вакцин, иммуногеном в которых являются конъюгаты типа «наркотик – белок». Более того, из-за невысокой эффективности пассивных вакцин в последних своих работах авторы предлагают комбинировать их с классическими [22].

Российские ученые Научно-исследовательского института нормальной физиологии имени П.К. Анохина РАМН также исследовали моноклональные антитела, специфичные к морфину, для лечения опиатной зависимости. При этом у морфинизированных крыс уменьшалось зависимое поведение. Моноклональные антитела, по-видимому, действуют как пассивная вакцина, также авторы предполагают, что они воздействуют на мю-опиатные рецепторы таким образом, что уменьшается болезненная зависимость [23].

Более оригинальный подход предложили исследователи Научно-исследовательского института наркологии, занимающиеся разработкой вакцины против опиатов на основе антиидиотипических (вторичных) антител АИАт к морфину. АИАт в активном центре повторяют структуру морфина, поэтому они могут использоваться для активной иммунизации вместо морфинового конъюгата. Таким образом авторы решают проблему практического использования производного наркотического вещества в производстве вакцины. Первичные антитела получают у свиней, затем вторичные – у кроликов. Полученные АИА тестируются на морфинизированных мышах. Показана эффективность введения вакцины у морфинизированных мышей. Предполагается затем вводить их человеку [24].

ПРАКТИКА РАЗРАБОТКИ ВАКЦИН

Все перечисленные выше разработки противонаркотических вакцин находятся на стадиях предварительных исследований, доклинических исследований или поиска спонсоров для клинических исследований. На настоящий момент ни одна вакцина не прошла клинических испытаний и не выведена на рынок. Это связано также с исторически сложившейся ситуацией в данной области: ученые только несколько лет назад вернулись к данному подходу в лечении наркомании. Пока ни одна из разработок не дошла до прохождения клинических испытаний (есть успешные примеры прохождения доклинических исследований).

Дальше других продвинулись в создании подобных препаратов разработчики вакцин против никотиновой зависимости [27]. К настоящему времени создано три антиникотиновые вакцины, которые прошли клинические испытания I и II фаз на людях. Это вакцины Nic-Vax производства GlaxoSmithKline, NicQb производства Cytos Pharmaceuticals и вакцина TA-NIC производства Celtic Pharma.

Вакцина NicVAX успешно прошла I фазу клинических испытаний; после проведения II фазы был сделан вывод, что NicVAX «безопасна и хорошо переносима». В то время как большинство испытуемых продолжали курить, бросили курить шесть человек из группы с высокой введенной дозой вакцины, один человек из группы со средней дозой, никто из группы с низкой дозой и два человека из группы плацебо. Все они не начали курить снова, по крайней мере в течение тридцати дней. Фаза IIb показала статистически значимое различие в эффекте в зависимости от уровня антиникотиновых антител, выработавшихся у пациентов. Фаза IIb также была успешной, показав статистически значимые показатели прекращения курения в долгосрочной перспективе. Однако фаза III не прошла успешно, так как эффективность вакцины не была выше, чем плацебо [28].

Испытание вакцины NicQb показало сходные результаты в фазах II, IIb: бросили курить 30% испытуемых в сравнении с 21% в группе плацебо. Наилучшие результаты были достигнуты у лиц с высоким уровнем антител. Так, у лиц с высоким уровнем антител абстиненция в течение 6 и 12 мес. после начала лечения наблюдалась в 57% случаев (p=0,004 в сравнении с 31% в группе плацебо) и в 42% случаев (в сравнении с 21% в группе плацебо) соответственно. В группе с низким уровнем антител эти частоты составили соответственно 32 и 26%, то есть практически не различались [29].

В клинических испытаниях вакцины TA-NIC (II фаза) показана эффективность в зависимости от дозы: через 12 мес. частота отказа от курения в группе лиц, получивших самую большую дозу вакцины, существенно превысила частоту в контрольной группе (38% против 8%). В настоящее время проводятся испытания фазы III (результаты еще не опубликованы).

Таблица 1.

Данные практического состояния исследований по разработке вакцин

№ п/п	Аналоги	Стадия	Разработчик	Принцип действия	Макромолекулярный носитель	Конструкция иммуногена	Длительность иммунитета
1	Антигероиновая вакцина	Предварительные исследования	Научно-исследовательский институт сухопутных войск им. Уолтера Рида, США	Выработка иммунитета	Токсин столбняка. Адъювант: липосомы с монофосфолипидом А.	Белок :гаптен (160 кДа)	Неизвестно
2	Антиопиатная вакцина	В разработке	Медицинский колледж Baylor, США	Выработка иммунитета	Гемоцианин моллюска	Белок :гаптен (4 МДа)*	Неизвестно
3	Антигероиновая вакцина	Прошла ДИ, ищут спонсора для КИ	Исследовательский институт Скриппса, США	Выработка иммунитета	Гемоцианин моллюска	Белок :гаптен (4 МДа)*	2–3 мес. (грызуны)
4	Антиморфин-героиновая вакцина	Предварительные исследования	Национальный институт психиатрии Рамона де ла Фуэнте Мюница, Мексика	Выработка иммунитета	Токсин столбняка	Белок :гаптен (160 кДа)	2 мес. (крысы)
5	Бивалентная вакцина против героина и оксикодона	В разработке	Университет Миннесоты, США	Выработка иммунитета	Гемоцианин моллюска	Белок :гаптен (4 МДа)*	Неизвестно
6	Антиопиатная вакцина	В разработке	Пекинский университет, Китай	Выработка иммунитета	Гемоцианин моллюска	Белок :гаптен (4 МДа)	Неизвестно
7	Вакцина против опиатов	Пройдены ДИ, сейчас исследования не ведутся	Уральский государственный медицинский университет	Выработка иммунитета	Человеческие белки + полиоксидоний	(1,5-5) полимер : белок : (2-17) гаптен (500 кДа)	12 мес. после нескольких иммунизаций (предполож.)
8	Вакцина против опиатов	В разработке	Научно-исследовательский институт наркологии	Выработка иммунитета, вторичные антитела	Антиидиотипические антитела	Первичные Ат – свиные, вторичные – кроличьи	Неизвестно
9	Вакцина против опиатов	Предварительные исследования, сейчас исследования не ведутся	Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П. К. Анохина РАМН	Пассивная иммунизация + коррекция рецепторов	Моноклональные специфические антитела	–	Неизвестно
10	Антикокаиновая вакцина	Пройдены ДИ, показана эффективность у приматов	Медицинский колледж Вейла Корнеля, США	Выработка иммунитета	Капсидный белок аденовируса	Белок :гаптен (170 кДа)	13 недель (мыши), 7 недель (приматы)
11	Пассивная вакцина против метамфетамина	В разработке	Университет Арканзаса, США	Пассивная иммунизация + выработка иммунитета	Гемоцианин моллюска	Моноклональные специфические антитела МАт, МАт + белок:гаптен (4 МДа)	4 месяца (комбинированный подход) у крыс

Как подчеркивалось ранее, работы по созданию антинаркотических вакцин находятся на более ранних стадиях, в большинстве своем – на этапе предварительных исследований. В мире разрабатывается более 10 препаратов вакцин против наркотической зависимости, из них 6 – против опиатов. В таблице 1 приведены основные сведения всех разработчиков антинаркотических вакцин, включая стадию разработки, тип макромолекулярного носителя, конструкцию иммуногена и предположительную продолжительность действия вакцины.

Подавляющее большинство разработчиков используют конструкции иммуногена следующего типа: производное наркотика, соединенное с белком-носителем. Варьируется тип белка, конструкция «мостика» между гаптеном и белком. Большинство исследователей используют чужеродные белки в качестве носителей из-за их большей изученности и иммуногенности: чужеродный белок неспецифически усиливает иммунный ответ. Человеческие белки использовались только в двух разработках, обе успешно прошли доклинические исследования, но в настоящее время эти разработки развития не получили.

Из существующих в мире разработок антиопиатных вакцин две успешно прошли доклинические испытания. Российская работа не получила дальнейшего продолжения, так как разработчик не смог найти инвестора для клинических испытаний. Разработка Исследовательского института Скриппса (США), прошедшая доклинические исследования, также пока приостановлена до момента привлечения инвестора.

Остальные разработки находятся на разных стадиях предварительных исследований, подтверждения научной гипотезы. 4 организации прекратили исследования по данной теме, возможно, переключившись на другие направления исследований. Однако 6 организаций активно продолжают исследования. Среди них Научно-исследовательский институт сухопутных войск им. Уолтера Рида (США), работа которого поддерживается главной организацией США по исследованиям наркотиков – Национальным институтом наркотических веществ (NIDA). Лидер в разработке вакцины против опиатов (пройдены доклинические исследования) – Исследовательский институт Скриппса, крупное научное учреждение США.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрев современные разработки в области создания вакцин для лечения наркомании, проанализировав количество публикаций в последние годы и учитывая высокую репутацию организаций, их проводящих, можно сделать вывод о том, что данное направление является перспективным и актуальным. Основные проблемы заключаются в недостаточной эффективности уже разработанных прототипов, в поиске наиболее эффективной конструкции для получения максимально сильного и долгого иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирный доклад о наркотиках. 2015 год. Управление Организации Объединенных Наций по наркотикам и преступности. Организация Объединенных Наций: Нью-Йорк, 2015.
2. Медико-социальные проблемы. Информационный бюллетень Всемирной организации здравоохранения. 2009. Документационный центр Всемирной организации здравоохранения. URL: http://whodc.mednet.ru/ru/component/attachments/download/35.html (дата обращения).
3. Выступление председателя Государственного антинаркотического комитета, директора ФСКН России В.П. Иванова на заседании ГАК 11.12.2013. URL: http://www.fskn.gov.ru/includes/periodics/speeches_fskn/2013/1211/092527919/detail.shtml (дата обращения 18.10.2016).
4. Основные показатели деятельности наркологической службы Российской Федерации в 2013–2014 гг.: статистический сборник. Минздрав России. – М.: НИИ наркологии – филиал ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России. 2016. 141 с.
5. О состоянии здоровья населения и организации здравоохранения по итогам деятельности органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации за 2013 год.: доклад Министерства здравоохранения Российской Федерации. 2013. URL: https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/doklad_2013 (дата обращения 18.10.2016).
6. Т.Н. Дудко. Состояние медико-социальной реабилитации наркологических больных в Российской Федерации // Вопросы наркологии. 2013. № 3. С. 70–76.
7. Использование налтрексона в лечении опиоидной зависимости в Российской Федерации: Ситуационный анализ // Проект политики в здравоохранении / N. Judice. – Вашингтон: Futures Group. 2012. URL: http://www.healthpolicyproject.com/pubs/72_RUSRussiaNaltrexoneReportFinal.pdf (дата обращения 18.10.2016).

8. М. Зобин, А. Егоров. Ремиссии при опиоидных наркоманиях (обзор). // Психическое здоровье. 2006. № 10. С. 36Ш.
9. Об организации работы по контролю за соблюдением субъектами Российской Федерации условий предоставления субсидий в целях реализации мероприятий приоритетного национального проекта «Здоровье» в 2011 году. Приказ № 475. Утвержден Минздравсоцразвития РФ 08.06.2011.
10. Об утверждении «Стандартов профилактики, лечения и реабилитации наркологических заболеваний». Приказ Департамента здравоохранения г. Москвы от 12.03.2003 № 114.
11. B. Anton, A. Salazar, A. Flores, M. Matus, R. Marin, J.A. Hernandez, P. Leff. Vaccines against morphine/heroin and its use as effective medication for preventing relapse to opiate addictive behaviors. // Hum Vaccin. 2009. V. 5(4). P. 214–229.
12. J.E. Schlosburg, L.F. Vendruscolo, P.T. Bremer, J.W. Lockner, C.L. Wade at al. Dynamic vaccine blocks relapse to compulsive intake of heroin // Proc Natl Acad Sci USA. 2013. V. 110(22). P. 9036–9041.
13. G.R. Matyas, K.C. Rice, K. Cheng, F. Li, J.F. Antoline, M.R. Iyer at al. Facial recognition of heroin vaccine opiates: type 1 cross-reactivities of antibodies induced by hydrolytically stable haptenic surrogates of heroin, 6-acetylmorphine, and morphine // Vaccine. 2014. V. 32(13). P. 1473–1479.
14. R. Jalah, O.B. Torres, A.V. Mayorov, F. Li, J.F. Antoline, A.E. Jacobson at al. Efficacy, but not antibody titer or affinity, of a heroin hapten conjugate vaccine correlates with increasing hapten densities on tetanus toxoid, but not on CRM197 carriers // Bioconjug Chem. 2015. V. 26(6). P. 1041–1053.
15. T.A. Kosten, X.Y. Shen, P.W. O'Malley, B.M. Kinsey, E.D. Lykissa, F.M. Orson, T.R. Kosten. A morphine conjugate vaccine attenuates the behavioral effects of morphine in rats // Prog. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013. V. 45. P. 223-229.
16. P.T. Bremer, J.E. Schlosburg, J.M. Lively, K.D. Janda. Injection route and TLR9 agonist addition significantly impact heroin vaccine efficacy // Mol Pharm. 2014. V. 11(3). P. 1075–1080.
17. M.D. Raleigh, P.R. Pentel, M.G. LeSage. Pharmacokinetic correlates of the effects of a heroin vaccine on heroin self-administration in rats // PLoS One. 2014. V. 9(12). P. e115696.
18. M.D. Hambuchen, F.I. Carroll, D. Rüedi-Bettschen, H.P. Hendrickson, L.J. Hennings, B.E. Blough at al. Combining Active Immunization with Monoclonal Antibody Therapy To Facilitate Early Initiation of a Long-Acting Anti-Methamphetamine Antibody Response // J Med Chem. 2015. V. 58(11). P. 4665–4677.
19. Q.Q. Li, C.Y. Sun, Y.X. Luo, Y.X. Xue, S.Q. Meng, L.Z. Xu at al. A conjugate vaccine attenuates morphine- and heroin-induced behavior in rats // Int J Neuropsychopharmacol. 2014. V. 18(5). P. pyu093.
20. M.J. Hicks, S.M. Kaminsky, B.P. De, J.B. Rosenberg, S.M. Evans, R.W. Foltin at al. Fate of systemically administered cocaine in nonhuman primates treated with the dAd5GNE anticocaine vaccine // Hum Gene Ther Clin Dev. 2014. V. 25(1). P. 40–49.
21. Патент US № 20120269828, WO/2011/050158 I. Anti-Drug Vaccines / S.X. Deng, D. Landry, G. Kalantarov, I. Trakht.
22. Патент РФ № 2236257. Синтетический иммуноген для терапии и профилактики злоупотреблений наркотическими и психоактивными веществами / К.С. Косяков, В.Ю. Пленкин, В.Г. Ветошкин. Опубл. 15.09.2003.
23. M.D. Hambuchen, D. Rüedi-Bettschen, D.K. Williams, H. Hendrickson, S.M. Owens. Treatment of rats with an anti-(+)-methamphetamine monoclonal antibody shortens the duration of action of repeated (+)-methamphetamine challenges over a one month period // Vaccine. 2014. V. 32(47). P. 6213–6219.
24. M.D. Hambuchen, F.I. Carroll, D. Rüedi-Bettschen, H.P. Hendrickson, L.J. Hennings, B.E. Blough at al. Combining Active Immunization with Monoclonal Antibody Therapy To Facilitate Early Initiation of a Long-Acting Anti-Methamphetamine Antibody Response // J Med Chem. 2015. V. 58(11). P. 4665–4677.
25. Патент WO 2005032587 A1. Vaccine for prevention and treatment of opiate addiction / S.K. Sudakov. Опубл. 03.10.2003.
26. Патент РФ № 2548802. Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов / Н.Б. Гамалея, А.Г. Берзина, К.А. Шестаков, Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин, Ю.В. Фокин. Опубл. 28.11.2013.
27. J.J. Escobar-Chávez, C.L. Domínguez-Delgado, I.M. Rodríguez-Cruz. Targeting nicotine addiction: the possibility of a therapeutic vaccine // Drug Des Devel Ther. 2011. V.5. P. 211–224.
28. Nabi Biopharmaceuticals Announces Results of Second NicVAX(R) Phase III Clinical Trial. – Rockville, Md., 2011. URL: http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=100445&p=irol-newsArticle&ID=1626882&highlight= (дата обращения 18.10.2016).
29. E.H. Cerny, T. Cerny. Vaccines against nicotine // Hum Vaccin. 2009. V. 5(4). P. 200–205.

ИНТЕГРИРОВАННОЕ РЕШЕНИЕ ПО ПОЛУЧЕНИЮ **АФИ** ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ТВЁРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ОТ **ГК "ФАРМКОНТРАКТ"**

Термостат ICS i-Temp ci 90e

Обеспечивает контроль температуры в реакторе в диапазоне +20...+90С. В качестве теплоносителя используется вода под давлением. Обладает малым внутренним объемом и высокой мощностью нагрева/охлаждения, что позволяет поддерживать температуру с высокой точностью и быстро компенсировать температурные эффекты процесса.

Моноблочный Кулачковый Насос Inoxpa TLS

Позволяет перекачивать в реактор реагенты и растворители, в том числе жидкости с высокой вязкостью и суспензии. Конструкция насоса обеспечивает возможность безразборной очистки, регулировка расхода осуществляется при помощи частотного преобразователя.

Реакторная система Patent (Венгрия) объёмом 100 л.

Материал - нержавеющая сталь. Обеспечивает проведение химической реакции при повышенной температурой, в том числе в режиме кипячения растворителя, позволяет проводить контролируемую загрузку при помощи мерных ёмкостей и насоса, а также удалять излишки растворителя после окончания процесса методом прямой

Чиллер Julabo FLW7006

Обеспечивает эффективное охлаждение раствора в кристаллизаторе до температуры -10 С. Чиллер имеет водяное охлаждения и позволяет устанавливать заданное значение температуры в циркуляционном контуре. Мощный насос позволяет осуществить расположение чиллера в удалённом помещении.

Кристаллизатор BuchiGlasUster Mixing vessel 100.

В прозрачном аппарате при интенсивном перемешивании происходит охлаждение реакционной массы до выпадения кристаллов продукта. Сосуд имеет вентиль донного слива без «мёртвого объёма» с большим проходным диаметром для удобства выгрузки образовавшейся суспензии.

Горизонтальная фильтрующая центрифуга Heinkel H 1000 P

Центрифуга периодического действия предназначена для эффективного разделения суспензий объёмом до 170 л. Встроенная система промывки, управление с ПЛК в полностью автоматическом режиме. Режим предварительного и финального отжима для экономии время и максимальной эффективности процесса. Выгрузка осадка осуществляется автоматически через боковой порт при помощи специального ножа.

Вакуумно-сушильный шкаф Binder vdl 115.

Позволяет проводить эффективную осушку порошкообразных АФИ. В комплекте вакуумный мембранный насос, система улавливания паров. Полностью гладкая внутреняя поверхность из нержавеющей стали AISI316L позволяет легко проводить очистку после окончания работы.

Вихревая мельница FPS ProMill 12

Мельница обеспечивает прецизионный размол полученного порошка АФИ до размеров порядка 50-100 мкм. Конструкция обеспечивает наилучшие значения тонины помола. Полностью соответствует требованиям фармацевтических стандартов для обоурдования, применяемого для измельчения. Управление процессом осуществляется при помощи PLC-системы управления.

CIP/SIP-станция Inoxpa

Обеспечивает эффективную очистку всех аппаратов технологической цепочки. Имеет независимые контуры для промывки несколькими моющими растворами и стерилизации. Управление процессами мойки и стерилизации осуществляет в полностью автоматическом режиме при помощи ПЛК с сенсорным дисплеем.

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com

УДК 615.2; 539.61

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИДКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПРИ РАЗРАБОТКЕ СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ СПРЕЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЛОСТИ РТА

П.Г. Мизина[1,3]*, С.М. Левачев[2], П.М. Масесе[3], А.В. Панов[4], А.Е. Харлов[2], Н.В. Сугак[2], Д.О. Шаталов[4]

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, 7

2 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» (МГУ им. М.В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

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

4 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ), 119454, Россия, Москва, пр. Вернадского, 78

1 – Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants» (FGBNU VILAR), 7, Green str., Moscow, 117216, Russia

2 – Federal State Educational Institution of Higher Education «Moscow State University named after MV Lomonosov» (Moscow State University), 1,p. 3, Lenin Hillsst., Moscow,119991, Russia

3 – Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Russian Peoples' Friendship University» (RUDN), 6, Maclay str., Moscow, 117198, Russia

4 – Federal State Educational Institution of Higher Education «Moscow Technological University» (MITHT), 78, Vernadsky str., Moscow, 119454, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: mizina-pg@yandex.ru

Резюме. Теоретически обоснованы и экспериментально определены вязкость и адгезивные свойства экспериментальных составов жидких лекарственных форм в виде мицеллярного раствора и микроэмульсии с растительными экстрактами эвкалипта прутовидного (эвкалимин) и эхинацеи пурпурной (эстифан) с целью создания спрея. Доказано, что разработанные жидкие лекарственные формы являются мукоадгезивными, что дает возможность оказывать пролонгированное действие на поверхности слизистой полости рта.

Ключевые слова: вязкость, адгезия, эвкалимин, эстифан.

OPTIMIZATION OF THE RHEOLOGICAL PARAMETERS OF PILOT LIQUID DOSAGE FORMS IN THE DEVELOPMENT OF SPRAY PREPARATION AND TECHNOLOGY FOR ORAL CAVITY DISEASES TREATMENT

P.G. Mizina[1,3]*, S.M. Levachev[2], P.M. Masese[3], A.V. Panov[4], A.E. Harlov[2], N.V. Sugak[2], D.O. Shatalov[4]

Abstract. Theoretically substantiated and experimentally determined viscosity and adhesive properties of the experimental compositions of the liquid formulation with plant extracts of Eucalyptus (evkalimin) and Echinacea purpurea (estifan). It proved that are designed mucoadhesive pharmaceutical compositions that might provide a sustained action on the surface of the oral mucosa.

Keywords: viscosity, adhesive, evkalimin, estifan.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка лекарственных форм для лечения воспалительно-деструктивных заболеваний полости рта и глотки, которые занимают в настоящее время до 90% инфекционной патологии [1], является актуальной. Известно, что используемые для таких случаев препараты антибиотиков вызывают микроэкологический дисбаланс в ротовой полости, что приводит к грибковой суперинфекции [2]. Поэтому является необходимыми поиск новых активных ингредиентов и лекарственных форм, лишенных указанных недостатков.

Использование растительных экстрактов в технологии лекарственных форм для ЛОР-практики является целесообразным, так как они легче переносятся, значительно реже вызывают побочные эффекты и, как правило, не обладают кумулятивными свойствами [3].

Причем акцент исследователей в последнее время направлен на сочетание в одной лекарственной форме ингредиентов с антимикробной, противовоспалительной и иммуностимулирующей активностью, что позволяет оказывать на пораженную слизистую полости рта комплексное лечебное воздействие [4], а также добиваться коррекции состояния местного иммунитета и повышения сопротивляемости слизистых оболочек [5, 6]. Предпочтительными лекарственными формами для нанесения на слизистую полости рта являются спреи [7], обеспечивающие препарату высокую степень биологической доступности за счет большей площади контакта с биологическими тканями [8].

В связи с вышеизложенным целью работы явилось изучение возможности создания жидкой лекарственной формы – спрея с растительными экстрактами, обладающего адгезивными свойствами для обеспечения пролонгированного антимикробного, противовоспалительного и иммуностимулирующего действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

В качестве объектов исследования выбраны экспериментальные жидкие лекарственные формы (ЖЛФ) в виде мицеллярного раствора [9] и микроэмульсии [10] с растительными экстрактами эвкалипта прутовидного (эвкалимин) [11] и эхинацеи пурпурной (эстифан) [12]. Выбор их в качестве активных фармацевтических субстанций обусловлен высокой антимикробной активностью эвкалимина в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis, Bacillus antracoides, Corynebacterium diphteriae,* его безопасностью и лечебным эффектом при осложнениях, вызванных антибиотико- и химиотерапией [13], и противовоспалительным и иммуностимулирующим действием эстифана, активизирующего неспецифичную резистентность организма.

Для придания лекарственным формам необходимых свойств (вязкость, адгезия и др.) при разработке их составов использованы вспомогательные вещества из разных групп:

- мукоадгезивные высокомолекулярные соединения (ВМС) [14, 15]: альгинат натрия (*Natrium alginatum*) (АН, ФСП 42-0372-3392-06, Россия) и метилцеллюлоза (*Methylcellulose*) (МЦ-100, Benecel A15C Pharm, Великобритания, соответствует USP);
- поверхностно-активные вещества (ПАВ): твин-20 (сорбитонмонолаурат) (OLEON, Бельгия, БН 404030001, соответствует EP, USP), твин-80 (полисорбат-80, OLEON, Бельгия, НП OE50226X01, соответствует EP) и соевый лецитин (ТУ 9146-006-576002012, ООО «Амурагроцентр»);
- нипагин (*Nipaginum*) [16].

Все водные растворы готовили на воде очищенной (ФС 2.2.0020.15) [17].

Методы исследования

Определение адгезии [18] растворов полимеров и композиций на их основе проводили на анализаторе текстуры Brookfield CT3 (США) с программным обеспечением. Для выполнения анализа испытуемый образец тонким слоем наносили на предметный столик с помощью прибора COATMASTER 510 (ERICHSEN, Германия). Начальная толщина слоя жидкости (пленки) составляла 1,0 мм. Полученные результаты измерения заносили в таблицу и проводили их статистическую обработку.

Анализатор текстуры Brookfield CT3 внесен в Госреестр средств измерения Российской Федерации.

Адгезивные свойства ЖЛФ напрямую связаны с ее вязкостью. Реологические свойства (кривые течения, вязкость) растворов полимеров определяли методом ротационной вискозиметрии. Измерения проводили на вискозиметре RheoStress 1 (HAAKE, Германия) с системой «конус – плоскость» (∅ конус = 60 мм, α = 2°) в CR-режиме со скоростью сдвига 0,003–1000 $с^{-1}$ при температуре 20 °С, точность поддержания данного значения температуры составляла 0,5 °С. Толщина измерительного зазора составляла для тонкого слоя жидкости (тонкой пленки) 0,050 мм, а для характеристики объёмных реологических свойств – 0,200 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения исследований приготовлены экспериментальные составы мицеллярного раствора и микроэмульсии, представленные в таблице 1.

Таблица 1.

Составы ЖЛФ с растительными экстрактами эвкалипта прутовидного (эвкалимин) и эхинацеи пурпурной (эстифан)

Наименование ингредиента	Мицеллярный раствор	Микроэмульсия
Экстракт сухой эвкалипта прутовидного (эвкалимин)	0,1	0,1
Экстракт сухой эхинацеи пурпурной (эстифан)	0,1	0,1
Спирт этиловый 96%	1,0	1,0
Смесь ПАВ: твин-20/ твин-80 (в соотношении 1:4)	0,1	0,1
Лецитин соевый	–	0,1
ВМС (АН или МЦ-100)	2,96	2,96
Нипагин	0,05	0,05
Вода очищенная	95,69	95,59

Для обеспечения устойчивости тонкой пленки, создаваемой ЖЛФ на обрабатываемой поверхности, требуется максимальная вязкость, и в то же время для получения факела распыла спрея необходима минимальная вязкость системы. Эти два фактора и определяют необходимость оптимизации реологических параметров лекарственной формы.

Молекулы АН содержат карбоксильные группы наряду с гидроксильными. В молекулах МЦ часть гидроксильных групп образует простой эфир с метиловым спиртом. Степень их модификации составляет 30–35%. Следовательно, можно ожидать, что эти полимеры будут образовывать на поверхности слизистых тонкие пленки, отличающиеся друг от друга значениями реологических параметров.

Выбор оптимальной концентрации каждого из используемых полимеров проводили в режиме сравнения реологических свойств полученных тонких пленок с параметрами пленки, полученной на основе 4% раствора муцина. Этот гликопротеин был выбран в качестве объекта сравнения, так как он является основным полимерным компонентом слизистых оболочек.

Исследовали реологические свойства двух типов слоев растворов ВМС. Первый тип представлял собой тонкую пленку толщиной 50 мкм. Данная система моделировала поведение тонкой пленки раствора полимера, нанесенного на твердую поверхность. Второй тип представлял собой толстую пленку толщиной 200 мкм, реологические свойства которой рассматривались в качестве объёмной характеристики поведения раствора полимера на поверхности слизистой.

При выполнении работы первоначально были получены кривые течения тонкой пленки муцина (рисунок 1).

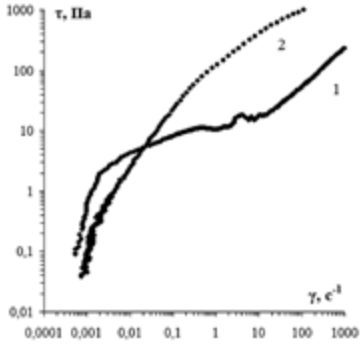


Рисунок 1. Кривые течения тонких пленок, сформированных из 4% раствора муцина (1) и 3,0% раствора МЦ (2) (толщина пленки 50 мкм)

Из данных, представленных на рисунке 1, видно, что тонкая пленка, сформированная из раствора муцина, характеризуется пределом текучести порядка 2,5 Па, то есть при напряжении менее 2,5 Па пленка муцина ведет себя как твердообразное тело. При больших механических нагрузках начинается ее течение, характеризующееся неньютоновским характером. Следовательно, пленка муцина, как и слизистая оболочка, характеризуется упруго-вязким состоянием. Структура такой пленки может быть охарактеризована как гелеобразная.

Пленки, сформированные из 3,0% раствора МЦ-100, во всем исследованном интервале напряжений характеризуются поведением, типичным для неньютоновской жидкости. Причем до значения напряжения порядка 7 Па пленка МЦ-100 имеет меньшие значения, а после – большие значения скорости течения. Таким образом, тонкая пленка МЦ-100, хотя и не представляет собой гель, при малых скоростях деформирования имеет большую вязкость, чем пленка муцина, характеризующаяся гелеобразностью. Поэтому МЦ-100 может обеспечивать эффективную устойчивость тонкой пленки, сформированной из ее раствора, к действию механических сдвиговых напряжений.

На рисунке 2 представлены кривые течения и вязкости растворов МЦ-100 и тонких пленок, сформированных из них.

Все исследованные системы отвечают неньютоновскому типу течения. Таким образом, в интервале концентраций 0,5–4,0% водный раствор МЦ-100 не образует геля. Все системы МЦ-100 (объёмные и тонкие пленки) представляют собой вязкие растворы, характеризующиеся аномальным (зависящим от величины скорости течения) значением вязкости. Причем для пленок, имеющих толщину 50 мкм, наблюдаются более высокие значения реологических параметров по сравнению с объёмными характеристиками.

На рисунке 3 представлены кривые течения и зависимости вязкости от скорости деформирования растворов АН и тонких пленок, сформированных из них.

Полученные результаты реологических испытаний в системах, содержащих АН, показали ход зависимостей, аналогичный обнаруженным для МЦ-100.

Таким образом, растворы МЦ-100 и АН в исследованном диапазоне концентраций рассматриваются как неньютоновские жидкости. Реологические параметры тонких пленок, сформированных из растворов АН и МЦ-100, в большей степени, чем объёмная вязкость растворов, зависят от природы полимера. Для

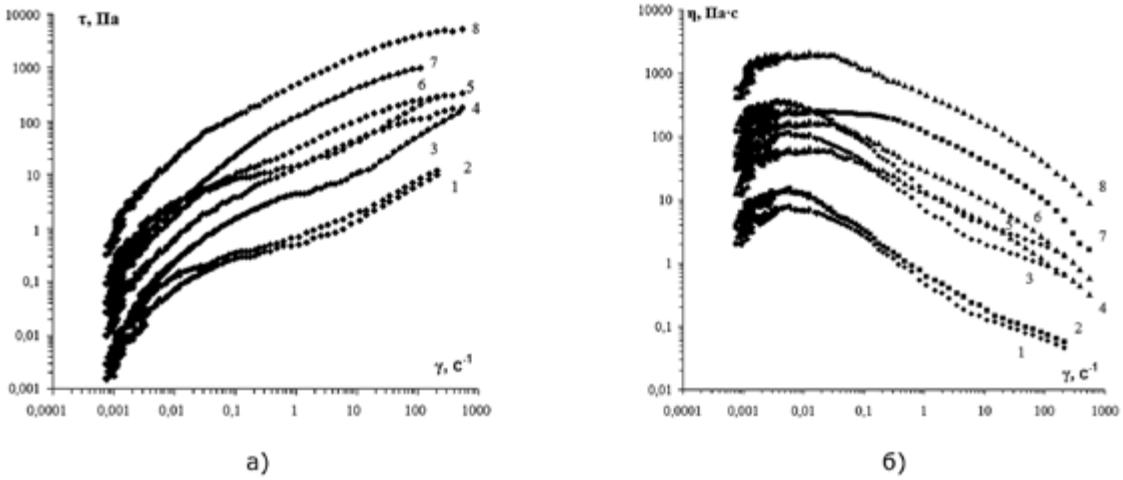


Рисунок 2. Кривые течения (а) и зависимости вязкости от скорости потока (б) растворов МЦ-100 и тонких пленок, сформированных из растворов при различных концентрациях полимера: 0,5% – 1 (пленка 200 мкм), 4 (пленка 50 мкм); 1,5% – 2 (пленка 200 мкм), 6 (пленка 50 мкм); 3,0% – 3 (пленка 200 мкм), 7 (пленка 50 мкм); 4,0% – 5 (пленка 200 мкм), 8 (пленка 50 мкм)

систем, содержащих МЦ-100, вязкость тонких пленок более чем на порядок выше соответствующих значений для систем, полученных на основе АН. Наиболее яркой характеристикой различия реологических свойств исследуемых систем являются максимальные значения вязкости, регистрируемые в диапазоне скоростей деформирования от 0,005 до 0.01 $с^{-1}$. Более высокие значения вязкости тонких пленок МЦ-100 при низких значениях скорости потока определяются поведением анизометричных молекул МЦ-100 в тонком слое (таблица 2).

Таблица 2.

Зависимость объемной и максимальной вязкости растворов от концентрации МЦ-100 и АН при скорости деформирования тонких пленок 60 $с^{-1}$

Концентрация полимера, %		η (обьемная), Па · с	η (максимальная), Па · с
МЦ	0,5	0,071±0,002	100±15
	1,5	0,089±0,004	110±20
	3,0	0,10±0,02	210±20
	4,0	0,83±0,05	1100±80
АН	0,5	0,026±0,001	10±1
	1,5	0,038±0,002	12±1
	3,0	0,10±0,02	14±2

Представленные результаты показывают, что в интервале концентраций МЦ-100 и АН 1,5–3,0% вязкость растворов при скорости деформирования системы 60 $с^{-1}$ лежит в пределах 0,038–0,1 Па·с. При увеличении концентрации полимера, как показано для МЦ-100, происходит резкое увеличение объёмной вязкости раствора, что может оказать негативное влияния на процесс распыления жидкости.

Следовательно, верхним пределом концентрации полимера, который не оказывает негативного воздействия на процесс распыления ЖЛФ, можно выбрать значение, равное 3%.

В интервале концентраций МЦ-100 и АН в растворах, использованных для формирования тонких пленок, значение максимальной вязкости колеблется в пределах от 10 до 14 и от 100 до 210 Па·с для АН и МЦ-100 соответственно. В исследованных интервалах концентрации растворы полимеров АН и МЦ-100 представляют собой по типу реологического поведения неньютоновские жидкости. Следовательно, ни в тонкой пленке, ни в объёме раствора АН и МЦ-100 не образуют гелей. Значительное повышение вязкости растворов МЦ-100 в тонкой пленке может быть связано с ориентированностью молекул на твердой поверхности.

Таким образом, использование МЦ-100 и АН в составе спрея позволит не только повысить вязкость системы, что важно для регулирования процесса распыления, но и приведет к получению высоковязких тонких пленок. Значение вязкости, близкое к вязкости муцинового слоя слизистых оболочек, – фактор, который открывает возможности создания лекарственных препаратов с необходимой пролонгированностью действия.

При определении адгезии исследуемых образцов в качестве модели поверхности слизистой оболочки выбрана тонкая пленка, полученная из 4% раствора муцина, нанесенная на поверхность стальной пластины (марка стали AISI 304). Муциновый слой, а затем и исследуемые образцы наносили автоматически с помощью COATMASTER 510.

На текстурометре Brookfield CT3 определяли усилия отрыва индентора от тонких пленок, полученных из растворов МЦ-100 и АН, а также лекарственных композиций на их основе в зависимости от концентрации компонентов и их состава.

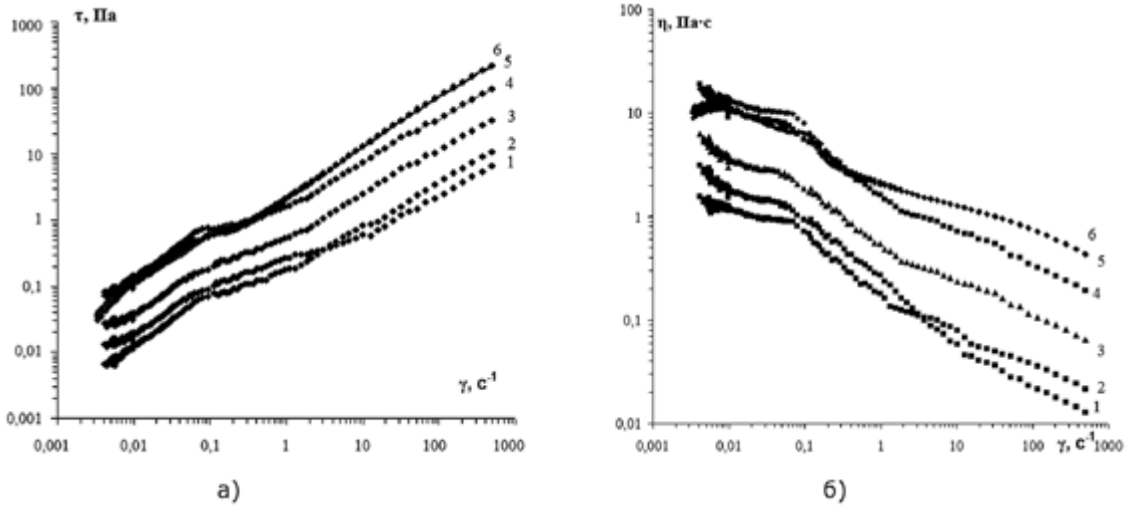


Рисунок 3. **Кривые течения (а) и зависимости вязкости (б) от скорости потока растворов АН и тонких пленок, сформированных из растворов при различных концентрациях полимера: 0,5% – 1 (пленка 200 мкм), 4 (пленка 50 мкм); 1,5% – 2 (пленка 200 мкм), 5 (пленка 50 мкм); 3,0% – 3 (пленка 200 мкм), 6 (пленка 50 мкм)**

Результаты измерений представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3.

Результаты определения адгезивных свойств ЖЛФ на основе МЦ-100

Концентрация ингредиентов, %					
МЦ	ПАВ	лецитин	фито-экстракты	нипагин	P, 10^3 Па
0,5	0	0	0		3,6±0,3
1,5	0	0	0		5,4±0,5
3,0	0	0	0		6,1±0,2
4,0	0	0	0		8,6±0,8
1,5	0,1	0	0		4,3±0,2
3,0	0,1	0	0		5,5±0,6
4,0	0,1	0	0		7,2±0,3
1,5	0,2	0	0		4,1±0,2
3,0	0,2	0	0		5,7±0,7
4,0	0,2	0	0		7,1±0,4
1,5	0	0,1	0		3,1±0,6
3,0	0	0,1	0		4,8±0,2
4,0	0	0,1	0		6,5±0,3
1,5	0	0,2	0		2,7±0,3
3,0	0	0,2	0		4,3±0,5
4,0	0	0,2	0		5,1±0,7
1,5	0,1	0	0,1	0,05	4,1±0,6
3,0	0,1	0	0,1	0,05	5,8±0,7
4,0	0,1	0	0,1	0,05	7,1±0,8
1,5	0,1	0,1	0,1	0,05	2,8±0,3
3,0	0,1	0,1	0,1	0,05	4,3±0,5
4,0	0,1	0,1	0,1	0,05	6,3±0,8
1,5	0,2	0,2	0,3	0,05	2,1±0,3
3,0	0,2	0,2	0,3	0,05	3,3±0,4
4,0	0,2	0,2	0,3	0,05	4,9±0,5

Таблица 4.

Результаты определения адгезивных свойств ЖЛФ на основе АН

Концентрация ингредиентов, %					
АН	ПАВ	лецитин	фито-экстракты	нипагин	P, 10^3 Па
0,5	0	0	0		5,2±0,4
1,5	0	0	0		7,3±0,6
3,0	0	0	0		8,1±0,8
4,0	0	0	0		8,9±0,7
1,5	0,1	0	0		4,3±0,2
3,0	0,1	0	0		6,5±0,3
4,0	0,1	0	0		8,2±0,5
1,5	0,2	0	0		3,9±0,4
3,0	0,2	0	0		6,7±0,7
4,0	0,2	0	0		8,1±0,8
1,5	0	0,1	0		4,1±0,4
3,0	0	0,1	0		6,8±0,8
4,0	0	0,1	0		7,5±0,6
1,5	0	0,2	0		3,6±0,3
3,0	0	0,2	0		5,7±0,5
4,0	0	0,2	0		6,1±0,3
1,5	0,1	0	0,1	0,05	4,2±0,3
3,0	0,1	0	0,1	0,05	6,8±0,8
4,0	0,1	0	0,1	0,05	8,1±0,7
1,5	0,1	0,1	0,1	0,05	3,9±0,2
3,0	0,1	0,1	0,1	0,05	6,3±0,7
4,0	0,1	0,1	0,1	0,05	7,2±0,6
1,5	0,2	0,2	0,3	0,05	3,2±0,4
3,0	0,2	0,2	0,3	0,05	5,4±0,8
4,0	0,2	0,2	0,3	0,05	5,8±0,5

Как показывают результаты, усилие отрыва индентора от слоя жидкости (пленки), полученной из 4% раствора муцина, составляет величину $(6,8 \pm 0,5) \cdot 10^3$ Па.

Для растворов МЦ-100 и АН при увеличении концентрации полимера наблюдается возрастание величины липкости пленки.

Для АН получены более высокие значения усилия, необходимого для отрыва индентора, чем для систем, содержащих МЦ-100.

Эта зависимость противоположна изменению вязкости растворов и тонких пленок в этих системах. Для МЦ-100 вязкость растворов, особенно тонких пленок, сформированных из них, превышает значения вязкости систем, содержащих АН, при одинаковых концентрациях полимеров в растворах.

Введение в раствор ПАВ, и особенно лецитина, приводит к снижению значений усилий, необходимых для отрыва индентора. Полученные результаты показывают, что увеличение содержания гидрофобных компонентов приводит к снижению как величин энергий когезии, так и адгезии раствора к твердой поверхности, связанных с величиной поверхностного натяжения исследуемого раствора.

Более значимые изменения величины липкости, регистрируемые при введении ПАВ и лецитина, происходят в системах с МЦ-100 относительно растворов АН. Такое поведение растворов полимеров объясняется тем, что АН имеет большое количество карбоксильных групп в составе молекулы, определяющих высокий вклад электростатических взаимодействий в энергию адгезионного контакта раствора АН с твер-

дой поверхностью. Таким образом, снижение поверхностного натяжения в растворах АН, более низкая вязкость относительно МЦ-100 в значительной степени нивелируется полярными взаимодействиями между макромолекулами АН и молекулами муцинового слоя.

Увеличение концентрации ПАВ и лецитина в наименьшей степени влияет на липкость растворов АН относительно систем с МЦ-100, что подтверждает роль электростатических взаимодействий в энергетической характеристике адгезионных контактов растворов полимеров с твердой подложкой.

Введение в систему растительных экстрактов (смеси эвкалимина и эстифана) в незначительной мере приводит к снижению липкости пленок. Такое незначительное снижение усилия отрыва индентора от пленки свидетельствует о том, что растительные экстракты находятся внутри мицелл ПАВ или капель микроэмульсии.

Проведенные исследования липкости пленок, полученных на основе растворов МЦ-100, АН и растительных экстрактов, солюбилизированных смесью твин-20/твин-80 и лецитином, показывают, что разработанные лекарственные композиции являются мукоадгезивными [18] и могут обладать пролонгированным действием на поверхности слизистой.

Более низкие значения вязкости тонких пленок, сформированных из растворов АН, компенсируются более высокими значениями липкости, определяемой ионными взаимодействиями макромолекул с материалом поверхности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, адгезию экспериментальным ЖЛФ придает и МЦ-100, и АН в концентрации 3%. Наличие адгезивных свойств позволяет прогнозировать пролонгированное действие препарата и возможность использования низких концентраций активных фармацевтических субстанций.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.Ю. Овчинников, В.А. Габедава, И.А. Овчинников. Опыт лечения воспалительных заболеваний ротоглотки // Фарматека. 2007. № 4. С. 48–52.
2. В.В. Гофман. Дисбиотическое состояние слизистой оболочки небных миндалин как локальное проявление системного микроэкологического дисбаланса – основная причина возникновения хронического тонзиллита (аналитический обзор) // Российская оториноларингология. 2014. № 4(71). С. 32–38.
3. С.А. Вичканова. Лекарственные средства из растений. – М., 2009. С. 347–370.
4. Г. Бут. Преимущества назначения комплексных препаратов растительного происхождения для лечения заболеваний ЛОР-органов // Электронный ресурс. URL: http://www.health-ua.org/archives/health/503.html (дата обращения 27.03.2015).
5. С.А. Иваничкин. Особенности местного лечения воспалительных заболеваний ЛОР-органов у детей // Вопросы современной педиатрии. 2011. Т. 10. № 6. С. 72–76.
6. В.Р. Гофман. Состояние иммунной системы при острых и хронических заболеваниях ЛОР-органов // Иммунодефицитные состояния / Под ред. Смирнова В.С., Фрейдлин И.С. – СПб.: Фолиант, 2000. С. 163–187.
7. Государственный реестр лекарственных средств. 2013. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx (дата обращения 11.10.2016).
8. К.В. Алексеев, Н.В. Тихонова, Е.В. Блынская, Е.Ю. Карбушева, К.Г. Турчинская, А.С. Михеева, В.К. Алексеев, Н.А. Уваров. Технология повышения биологической и фармацевтической доступности лекарственных веществ // Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т. 9. № 4. С. 43–47.
9. K.M. Glenn, S. Moroze, R.M. Pal. Effect of ethylene glycol on the thermodynamic and micellar properties of Tween 40, 60, and 80 // J. Dispersion Sci. Technol. 2005. № 26. P. 79–90.
10. H. Chen, Y. Guan, O. Zhong. Microemulsions based on a sunflower lecithin – Tween 20 blend have high capacity for dissolving peppermint oil and stabilizing coenzyme Q10 // J. Agric. Food Chem. 2015. № 63. P. 983–987.
11. ФС 42-3606-98. Эвкалимин (Eucaliminum) // Государственая фармакопея.
12. ВФС 42-2372-94. Эстифан (Estiphanum) // Государственая фармакопея.
13. О.А.Семкина, Т.А. Сокольская, И.И. Краснюк, В.Ф. Охотникова, Н.М. Крутикова, С.А. Вичканова. Фитопрепарат антимикробного и противовоспалительного действия эвкалимин // Хим.-фарм. журнал. 2006. Т. 40. № 8. С 52–56.
14. Е.А. Харенко, Н.И. Ларионова, Н.Б. Демина. Мукоадгезивные лекарственные формы // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43. № 4. С. 21–31.
15. M.I. Ugwoke, R.U. Agu, N. Verbeke, R. Kinget. Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives // Adv. Drug. Del. Rev. 2005. № 57(11). P. 1640–1665.
16. ФС 42-1460-89. Нипагин (Nipaginum) // Государственая фармакопея.
17. ФС 2.2.0020.15. Вода очищенная (Aquapurificata) // Государственая фармакопея.
18. Е.А. Киржанова, В.В. Хуторянский, Н.Г. Балабушевич, А.В. Харенко, Н.Б. Демина. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 3(8). С. 66 –82.

УДК 615.453

1 – ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8

2 – ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Россия, 109240, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14

1 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – Scientific Research Institute of Nutrition, 2/14, Ustinskiy proezd, Moscow, 109240, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: sokmary@mail.ru
Тел.: 8 (495) 698 53 60

ТЕХНОЛОГИИ ПОВЫШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ (ОБЗОР)

Н.Л. Соловьёва[1], М.С. Сокуренко[1,2]*

Резюме. Природные полифенолы представляют собой ценные соединения, которые обладают свойствами связывать свободные радикалы и образовывать комплексы с белками. Поэтому фенольные соединения привлекают все большее внимание как потенциальные средства для профилактики и лечения многих окислительных стресс-зависимых заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, рак, старение, диабет и нейродегенеративные заболевания. Полифенольные соединения характеризуются очень высокой чувствительностью к некоторым экологическим факторам, включая физические, химические и биологические, и могут очень быстро окисляться со значительной потерей активности. Разработка новых подходов к стабилизации и защите этих соединений от разрушения и, следовательно, для улучшения их биологической активности представляет интерес. В литературе описаны различные методы инкапсуляции, многие из которых были успешно использованы для растительных полифенолов. В этом обзоре представлены некоторые растительные полифенолы, их основные химические и биологические свойства, а также методы инкапсуляции полифенолов, которые подразделяются на физические, физико-химические, химические и другие методы стабилизации.

Ключевые слова: полифенолы; антиоксидант; биодоступность, инкапсуляция.

TECHNOLOGIES TO IMPROVE THE STABILITY OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN DRUG DISCOVERY (REVIEW)

N.L. Solovieva[1], M.S. Sokurenko[1,2]*

Abstract. Natural polyphenols are valuable compounds possessing scavenging properties towards radical oxygen species, and complexing properties towards proteins. Therefore, phenolic compounds have attracted increasing attention as potential agents for preventing and treating many oxidative stress-related diseases, such as cardiovascular diseases, cancer, ageing, diabetes mellitus and neurodegenerative diseases. Polyphenolic compounds are characterized by a very high sensitivity to several environmental factors including physical, chemical and biological conditions and can be oxidized very quickly with a considerable loss in activity. Development of new approaches to stabilisation and protection of these compounds from degradation and therefore to improve their biological activity is of interest. The literature describes many encapsulation methods, many of which have been successfully used for plant polyphenols. This review provides some plant polyphenols and their basic chemical and biological properties as well as methods of encapsulating polyphenols, which are divided into physical, physico-chemical, chemical methods and other methods of stabilization.

Keywords: polyphenol; antioxidant; bioavailability, encapsulation.

ВВЕДЕНИЕ

Полифенолы представляют собой класс синтетических, полусинтетических, а также природных соединений, содержащихся в большинстве лекарственных и пищевых растений. Представители данной группы характеризуются наличием одного или нескольких бензольных колец и одной или более гидроксильных функциональных групп. В зависимости от химического строения выделяют несколько групп полифенолов [1]:

1. Стильбены (ресвератрол);

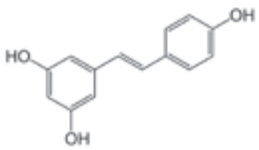


Рисунок 1. Структурная формула ресвератрола

2. Лигнаны (схизандрин);

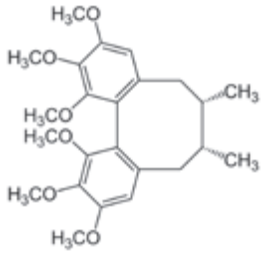


Рисунок 2. Структурная формула схизандрина А

3. Фенолокислоты (производные гидроксибензойной и гидроксикоричной кислот – феруловая, кофейная и др.);

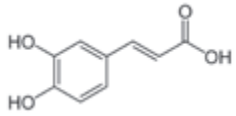


Рисунок 3. Структурная формула кофейной кислоты

4. Фенолоспирты (тирозол и его производные);

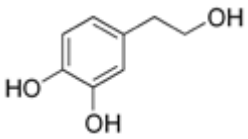


Рисунок 4. **Структурная формула гидрокситирозола**

5. Флавоноиды (наиболее широко распространённая и многочисленная; основными представителями являются апигенин, кемпферол, лютеолин, кверцетин гесперидин и др.). В основе всех флавоноидов лежит соединение, именуемое флаваном (формула приведена ниже).

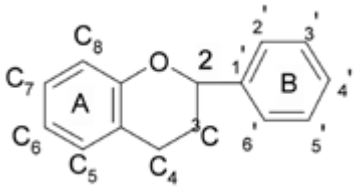


Рисунок 5. **Соединение, именуемое флаваном**

Источниками полифенолов являются чай, виноград/вино, оливковое масло, кофе, зерновые (рожь, пшеница, овес, ячмень), овощи семейства крестоцветных (брокколи, капуста), кора дуба, соплодия ольхи, корневища и корни кровохлебки, корневища змеевика, плоды аронии черноплодной, цветки боярышника, трава пустырника, трава сушеницы топяной и др. [2, 3, 4].

В последнее время возник большой интерес к растительным полифенолам. Это связано с открытием ряда биологически активных веществ, содержащихся в них, и установлением их роли в профилактике и развитии многих хронических заболеваний.

Эпидемиологические исследования показывают, что потребление полифенолов приводит к снижению риска развития целого ряда заболеваний, включая сердечно-сосудистые, нейродегенеративные [6], специфические формы рака [5]. В исследованиях флавоноидов было обнаружено, что они влияют на метаболизм липидов [7], ингибируют окисление липопротеинов низкой плотности [8], снижают образование атеросклеротических бляшек [9], ингибируют агрегацию тромбоцитов [10], улучшают функцию эндотелия [11] и снижают кровяное давление [12].

Кроме того, полифенолы способны ингибировать негативное воздействие бактериальных, вирусных и грибковых инфекций [13–17], тормозить развитие опухолей [18, 19], а также взаимодействовать с широким числом белков, таких как ферменты, белки тканей и мембранные рецепторы [20, 21], определенным образом модулируя их активность.

Несмотря на все преимущества, полифенолы обладают рядом свойств, затрудняющих процесс получения лекарственных форм, а именно: очень чувствительны к факторам окружающей среды (температура, свет), слабо растворимы в воде в свободной форме, а также быстро метаболизируются и выводятся из человеческого организма. Кроме того, эти соединения часто могут подвергаться окислению с последующей потерей активности, а из-за большой молекулярной массы очень плохо абсорбируются. Все эти факторы снижают стабильность и влияют на биодоступность, резко снижая их эффективность [22]. Также многие полифенольные соединения обладают неприятным и горьким вкусом, который ограничивает их потенциальное применение в форме пероральных препаратов.

Все эти факторы свидетельствуют о необходимости разработки новых стратегий, направленных на создание технологии получения лекарственных препаратов, не нарушающей целостности структурной формулы молекул, на продление срока годности препаратов на основе растительных полифенолов и на повышение их биодоступности.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ПОЛИФЕНОЛОВ

Эффективность полифенолов зависит от сохранения их структурной целостности при введении в лекарственную форму. Следовательно, основной задачей является изучение причин разрушения и устранение их в процессе производства лекарства.

Чувствительность различных полифенолов к физическим, химическим и биологическим факторам, а также основные виды лекарственного растительного сырья, являющиеся источниками полифенольных веществ, представлены в таблице 1 [23].

Из таблицы видно, что почти все соединения очень чувствительны к теплу, свету, pH и окислению. Для преодоления ряда данных проблем были разработаны способы стабилизации, основным из которых является инкапсуляция, как перспективный подход к защите чувствительных соединений от внешней среды и деградации.

Таблица 1.

Характеристика биологических, химических и физических свойств полифенолов

Класс полифенолов	Соединения	Природные источники	Биологические свойства
Антоцианидины	Цианидин, делфинидин, мальвидин, пеларгонидин, пеонидин, петунидин и их гликозиды	Фрукты, овощи, красное вино, некоторые виды зерновых, зверобой продырявленный (надземная часть), первоцвет многоцветковый (надземная часть), рис посевной (листья), водяника черная (плоды)	Природные пигменты; очень чувствительны к температуре, окислению, pH, свету; водорастворимы. Обладают противовоспалительным, противоаллергическим, противовирусным, спазмолитическим, антибактериальным, антиоксидантным и антиканцерогенным свойствами; гепатопротекторы, некоторые из них мощные ингибиторы ферментов
Катехины	Катехин, эпикатехин, галлокатехин, эпигаллокатеин и эпигаллокатехина галлат	Чайные листья, расторопша пятнистая, (плоды), горец змеиный (надземная часть), эвкалипт шариковидный (кора), боярышник мелколистный (листья), вишня кустарниковая (кора), черника обыкновенная (листья), облепиха крушиновая (листья)	Чувствительны к окислению, свету и pH; обладают вяжущим и горьким вкусом; слабо растворимы в воде
Флаваноны	Гесперетин, гесперидин, нарингенин, нарингин	Цитрусовые фрукты (грейпфрут, апельсин, лимон), некоторые виды мяты, зверобой продырявленный (надземная часть), лигустикум шотландский (корневища), курильский чай (листья, цветки), липа сердцевидная (цветки), расторопша пятнистая (плоды), черемуха (древесина, кора)	Чувствительны к окислению, свету и pH; агликоны нерастворимы, но гликозиды растворимы в воде; имеют горький вкус. Обладают противовоспалительным, противоаллергическим, противовирусным, спазмолитическим, антибактериальным, антиоксидантным и антиканцерогенным свойствами; гепатопротекторы, некоторые из них мощные ингибиторы ферментов
Флавоны	Апигенин, лютеолин, тангеритин, нобилетин, синенсетин	Фрукты/овощи, петрушка, сельдерей, зерновые (просо и пшеница), кожура цитрусовых, ромашка аптечная (цветы), одуванчик лекарственный (корень), ферула персидская (надземная часть), виснага морковевидная (плод), пижма обыкновенная (цветы), коровяк (медвежье ушко) (листья), хризантема садовая (цветки), бодяк полевой (лист)	Натуральные пигменты. Чувствительны к окислению и pH; агликоны слабо растворимы, но гликозиды растворимы в воде; Обладают противовоспалительным, противоаллергическим, противовирусным, спазмолитическим, антибактериальным, антиоксидантным и антиканцерогенным свойствами; гепатопротекторы, некоторые из них мощные ингибиторы ферментов
Флавонолы	Кемпферол, мирицетин, кверцетин и их гликозиды	Фрукты и овощи, красное вино, гинкго двулопастный (листья), ясень обыкновенный (лист, почки), боярышник мелколистный (лист, цветки), пустырник пятилопастный (надземная часть), володушка круглолистная (корень, лист, цветки), горец птичий (спорыш) (надземная часть), клевер (надземная часть), актинидия коломикта (лист), фисташка настоящая (лист)	Чувствительны к окислению, свету и pH; агликоны слабо растворимы, но гликозиды растворимы в воде; Обладают противовоспалительным, противоаллергическим, противовирусным, спазмолитическим, антибактериальным, антиоксидантным и антиканцерогенным свойствами; гепатопротекторы, некоторые из них мощные ингибиторы ферментов
Изофлавоны	Даидзеин, генистеин, глицитеин	Соевые бобы, арахис, бобовые растения (соя и продукты переработки сои), клевер луговой и полевой (листья), софора японская (плоды), каян индийский (кора), пуерария тумберга (цветы), хмель обыкновенный (шишки), псоралея лецинолистная (лист, семена)	Чувствительны к щелочной pH; обладают вяжущим и горьким вкусом; имеют соевый запах; растворимы в воде. Обладают противовоспалительным, противоаллергическим, противовирусным, спазмолитическим, антибактериальным, антиоксидантным и антиканцерогенным свойствами; гепатопротекторы, некоторые из них мощные ингибиторы ферментов
Гидроксибензойные кислоты	Галловая кислота, *п*-гидроксибензойная кислоты, ванильная кислота	Чайные листья, пшеница, красные ягоды (малина, черная смородина, клубника), солодка голая (корень), виноградные косточки	Чувствительны к температуре, окислению, pH и свету; наиболее растворимы в воде; весьма ограниченный терапевтический интерес, обладают антимикробной активностью и противовоспалительными свойствами салицилатов. Фунгитоксичны.

Окончание таблицы 1

Класс полифенолов	Соединения	Природные источники	Биологические свойства
Гидроксикоричные кислоты	Кофейная кислота, феруловая кислота, *п*-кумаровая кислота, синаповая кислота	Фрукты (киви, черника, яблоки), зерновые культуры (пшеница, рис, овсяная мука) эхинацея (цветы, корень), ромашка аптечная (цветки), одуванчик лекарственный (цветки, корень), лопух большой (листья, плоды), мелисса (листья), мята перечная (листья), крапива двудомная (надземная часть), мать-и-мачеха (листья), калина обыкновенная (плоды)	Чувствительны к окислению и pH; Наиболее слабо растворимы в воде; весьма ограниченный терапевтический интерес, обладают антимикробной активностью и противовоспалительными свойствами салицилатов. Фунгитоксичны.
Лигнаны	Пиноресинол, подофиллотоксин, стеганацин	Льняное семя, кунжут, зерновые (рожь, пшеница, овес, ячмень), крестоцветные овощи (брокколи, капуста) и фрукты (абрикосы, клубника)	Относительно стабильны при нормальных условиях; имеют неприятный аромат; водорастворимы. Гепатопротектор, антимитотическое, противовирусное, гипотензивное и цитостатическое действия, ингибиторы ферментативных реакций
Стильбены	Ресвератрол	Виноград (кожура, мякоть плодов, семена), горец (трава)	Противораковое, противовоспалительное действие
Таннины (проантоцианидины)	Касталин, процианидины,	Чайные листья, ягоды, вино, какао-бобы, береза повислая (кора, листья), эвкалипт мощный (кора, листья), калина обыкновенная (кора, плоды), грецкий орех (кожура), айва продолговатая (семена), гранат обыкновенный (кожура плодов)	Чувствительны к воздействию высоких температур и окислению; обладают вяжущим и горьким вкусом; водорастворимы

ТЕХНОЛОГИИ СТАБИЛИЗАЦИИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Инкапсуляция – это технология помещения твердых частиц, капель жидкости или молекулы газа в мельчайшие формы, которые затем могут высвобождать содержимое с контролируемой скоростью при определенных условиях и/или под влиянием определенного фактора [24, 25]. По этой технологии инкапсулированные молекулы заключены в матрицу или под оболочку с получением микрокапсул или микросфер. Размер микрочастиц может варьироваться от 1 микрона до нескольких миллиметров, но в большинстве случаев составляет менее 200 мкм, в то время как наночастицы характеризуются меньшим размером (от 1 нанометра до 1 мкм) [26]. Оболочка может состоять из природных или синтетических полимеров и липидов. Методы инкапсулирования, применяемые к этой группе природных веществ, можно разделить на три основные категории: физические, физико-химические и химические.

Физические методы: распылительная сушка и инкапсулирование с использованием сверхкритических флюидов; физико-химические методы включают коацервацию, ионное гелеобразование, эмульсии и методы, основанные на гидрофобных взаимодействиях (мицеллы, липосомы); примером химического метода является полимеризация in situ.

Распылительная сушка

Распылительная сушка представляет собой одноступенчатый экономичный и гибкий метод инкапсуляции с получением стабильных частиц высокого качества, который удобен для большего объёма производства с непрерывной работой [26]. Несмотря на преимущества, этот метод имеет некоторые недостатки, такие как ограниченное количество доступных материалов для изготовления водорастворимой оболочки с термостабильностью и высокой воздухопроницаемостью, и может привести к разрушению термочувствительных соединений [27]. При использовании более низких температур и подходящих материалов распылительная сушка позволяет сохранять свойства полифенолов.

Метод распылительной сушки (рисунок 6) состоит из следующих основных этапов:

- приготовление жидкой основы, содержащей действующее вещество и оболочку;
- распыление жидкой основы на мельчайшие капли;
- сушка распыленной основы;
- формирование частиц и их наполнение [24].

Полифенолы растворяются или диспергируются в растворе с водорастворимой оболочкой, полученный жидкий продукт гомогенизируют и подают на форсунку. Фаза атомизации позволяет подобрать оптимальные условия для выпаривания до сухого продукта с требуемыми характеристиками.

Распыленная жидкость контактирует с горячим газом, что приводит к испарению растворителя, содержащегося в каплях, в течение нескольких секунд. Полученные частицы собирают после того, как они

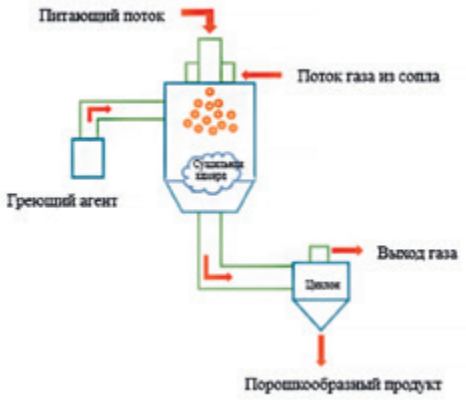


Рисунок 6. **Схема распылительной сушки**

падают на дно; они, как правило, имеют сферическую форму со средним размером от 10–100 мкм.

Материал для оболочки должен иметь высокую растворимость в воде и низкую вязкость при высоких концентрациях и должен быть способен сформировать защитный слой, окружающий активное ядро. Наиболее часто используемыми материалами для инкапсулирования полифенолов являются камедь, мальтодекстрин, модифицированный крахмал или их сочетания. Мальтодекстрины получают путем кислотного гидролиза различных типов крахмала. Они обладают высокой растворимостью в воде, низкой вязкостью и хорошей устойчивостью к окислению, но обладают плохой эмульгирующей способностью [28]. Альгинат представляет собой природный полисахарид, состоящий из линейного 1,4-связанного полимера β-D-маннуроновой кислоты и α-L-гулуроновой кислоты. Гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) является неионным эфиром целлюлозы, синтезированным путем химических реакций. Инулин представляет органическое вещество из группы полисахаридов, полимер D-фруктозы [29]. Альгинат натрия, метил-β-циклодекстрин (M-β-CD), гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) и инулин были использованы в качестве материала оболочки для сушки распылением при микрокапсуляции кверцетина и ванилина [30].

Исследования показали, что частицы, полученные с использованием альгината натрия и M-β-CD, характеризуются более сферической формой, меньшим средним размером и более высокой удельной поверхностью, чем те, что получены с использованием ГПМЦ или инулина. Эффективность инкапсуляции была выше у ванилина (37-53%), чем у кверцетина (9-19%), что связано с более низкой термической стабильностью последнего. Все эти данные говорят о том, что тип герметизирующего материала может влиять на площадь поверхности порошка, морфологию и эффективность инкапсулирования [23].

Виноградные семена являются источником молекул полифенола, таких как фенольные кислоты, катехины и проантоцианидины [31]. В научно-исследовательской работе группой ученых, изучающих процесс микрокапсуляции путем сушки (распылением экстракта виноградных косточек с использованием мальтодекстрина (MD), мескитовой камеди (MG), зеина (Z), а также их комбинаций [32]), было разработано оптимальное соотношение для покрытия. Полученные результаты показали, что наиболее эффективны смеси, содержащие 44% MG + 56% Z, 34% MD + 66% Z.

МЕТОД ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ ФЛЮИДОВ (СКФ)

Традиционные методы инкапсулирования имеют некоторые ограничения, связанные с использованием органических растворителей и поверхностно-активных веществ, температуры, а также с образованием токсичных продуктов при сушке и, как следствие, с риском разрушения полифенолов [23]. Сверкритическая жидкость может быть использована в качестве антирастворителя для того, чтобы отделить частицы активных соединений от обычных растворителей.

В сверхкритическом состоянии газы проявляют свойства жидкостей с чрезвычайно высокой растворяющей способностью и обладают свойствами газов, что обеспечивает высокий массообменный потенциал. Растворяющая способность сверхкритических газов в значительно большей степени зависит от физических параметров состояния, чем таковая обычных органических растворителей. Это обстоятельство позволяет посредством изменения только давления или температуры изменять плотность, динамическую вязкость и диффузионные свойства СКФ. Углекислый газ в сверхкритическом состоянии обладает высокой растворяющей способностью, а также имеет следующие преимущества: физиологически безопасен, не горит, не поддерживает горения, не является взрывоопасным газом, безопасен для окружающей среды, не приводит к образованию экологически вредных отходов, бактериостатический, недорогой, доступен в больших количествах для производственных нужд [33].

ПРОЦЕССЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ СВЕРКРИТИЧЕСКИХ ФЛЮИДОВ (СКФ) В КАЧЕСТВЕ АНТИРАСТВОРИТЕЛЯ (МЕТОД SAS)

Технология капсулирования с применением сверхкритических флюидов в качестве антирастворителя (SAS) была предложена для веществ с низкой растворимостью в СКФ. В этом случае находящийся

под давлением CO_2 играет роль антирастворителя, необходимого для осаждения веществ из их раствора в органическом растворителе. Вещество сначала растворяется в органическом растворителе, затем полученный раствор вводят в СК CO_2 [34].

Принцип такого процесса основан на способности органических растворителей растворять большое количество различных веществ; взаимной растворимости фазы СКФ и органической фазы; низком сродстве СКФ по отношению к растворенному веществу. CO_2 диффундирует в органический растворитель, вызывая тем самым его испарение и переход в газовую фазу; степень расширения объема определяет уменьшение плотности среды, которая, в свою очередь понижает растворяющую способность органического растворителя и приводит к выпадению осадка.

В случае получения частиц с использованием сжатого СКФ в качестве антирастворителя (метод SAS рисунок 7) раствор сначала закачивается в автоклав до тех пор, пока не будут достигнуты необходимые фиксированные давление и температура, затем растворенное в органическом растворителе вещество впрыскивается в автоклав, при этом образующиеся частицы собираются на фильтре на дне автоклава.

Для того чтобы улучшить защиту полифенолов от разрушающих факторов, таких как температура, свет и кислород, процесс SAS был применен к осаждению спиртового экстракта листьев розмарина (*Rosmarinus officinalis*) в полоксамере. [35] Полоксамеры – триблок-сополимеры, состоящие из полиоксиэтилена (POE) и полиоксипропилена (POP) (рисунок 8), широко используются в фармацевтической области из-за их способности образовывать гели в ответ на изменения температуры [36]. CO_2 был использован в качестве критического антирастворителя при умеренных температурах, и инкапсуляция экстракта была успешно достигнута с выходом до 100% частиц в субмикронном диапазоне. Характеристики микрочастиц, получаемых в процессе SAS, зависят от многих параметров процесса: температуры, давления, свойств полимера и др. Важнейшее влияние на характеристики микрочастиц оказывает молекулярная масса полимера, определяющая, в частности, его вязкость.

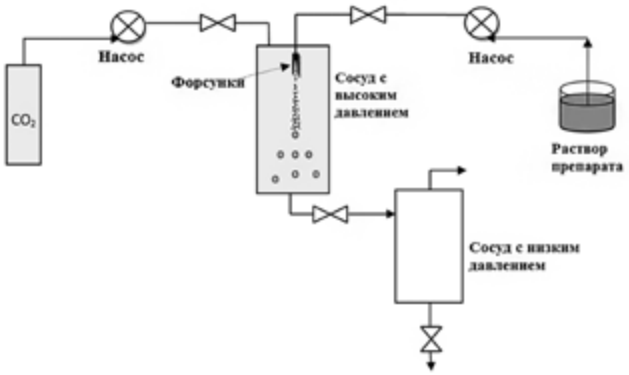


Рисунок 7. Схема процесса SAS

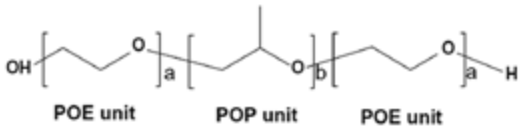


Рисунок 8. Химическая структура полоксамера

Полифенолы зеленого чая соосаждались с биоразлагаемым полимером (поли-ε-капролактон) путем полунепрерывного процесса с использованием диоксида углерода в качестве суперкритического антирастворителя. В данном исследовании основное внимание уделялось влиянию различных параметров процесса (давление и температура), соотношению концентрации полимера и раствора, соотношение CO_2 и скорости потока раствора. Содержание полифенолов составляло от 60 до 100% по отношению к максимальной теоретической величине, микрочастицы (3–5 μm) имели однородный размер. В большинстве экспериментов были получены сферические частицы с шероховатой поверхностью, тогда в эксперименте с низкими концентрациями полимеров были получены частицы с плоскими формами из-за осаждения экстракта на их поверхности [23].

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ

Коацервация

Коацервация основана на разделении водного полимерного раствора двух жидких фаз: плотной коацерватной фазы и разбавленной равновесной фазы, с последующим осаждением плотного коацервата вокруг активного компонента суспензии или эмульсии в той же реакционной среде [37]. Процесс коацервации включает в себя три основных этапа:

1. Формирование эмульсии типа «масло в воде», в которой маслянистые капельки основного вещества диспергируют в водном полимерном растворе;
2. Формирование покрытия, вызванного изменением в водной фазе;
3. Стабилизация покрытия путем термической обработки, десольвацией.

Этот метод инкапсуляции позволяет сформировать сферические формы и добиться улучшения стабильности полифенолов.

Антоцианы смородины были введены в глюкан (термообратимый желирующий агент) путем простого смешивания с горячим дисперсным гелем глюкана с последующим охлаждением [38]. Во время охлаждения раствора глюкана в воде с 80 °C до комнатной температуры антоцианы захватываются сетевой структурой полисахаридов. Восстановления 73–79%

инкапсулированных антоцианов в первоначальную форму можно достигнуть с помощью обычного сушильного шкафа путем испарения гелевой матрицы. Это исследование показало, что инкапсуляция антоцианов с использованием природных полимеров может повысить стабильность соединений этого класса.

В другом исследовании лиофилизированные экстракты падуба парагвайского (*Ilex paraguariensis*), содержащие 62,11±1,16 мг/г галловой кислоты, были инкапсулированы с использованием двух подходов: ионного гелеобразования с альгинатом кальция и коацервации с альгинатом кальция и хитозаном (сополимер N-ацетил-D-глюкозамин и D-глюкозамин, полученный путем N-деацетилирования хитина в щелочной среде) [39]. Хитозан характеризуется несколькими полярными функциональными группами, такими как -OH и -NH2, в то время как альгинат содержит группы карбоновых кислот. Таким образом, они могут вступать в реакцию коацервации в связи с их противоположными зарядами. Были подготовлены капельки альгината кальция с хитозановым слоем и без хитозанового слоя, для того, чтобы оценить влияние инкапсулирующей системы на механические свойства гранул и исследовать их влияние на стабильность полифенолов в готовом продукте. Получили 85% полифенолов в альгинатных каплях, количество капель с хитозановым покрытием было ниже, около 50%. Тем самым выявлены потери полифенольных соединений при покрытии из хитозана. Максимальное высвобождение в воде за более короткое время достигнуто при хитозановом покрытии. Эти результаты подтверждают влияние покрывающих материалов готового продукта на сохранность природных антиоксидантов.

МЕТОД ИОННОГО ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЯ

Метод ионного гелеобразования представляет собой физико-химический процесс, включающий экструдирование полимерного водного раствора, в котором активное соединение находится в растворенном или диспергированном состоянии. Капельки в фазе диспергируются и трансформируются в сферические частицы. Это происходит после процесса взаимодействия между хелатными комплексами с поливалентными ионами в геле [40].

При исследовании полифенолов чая капсулировали хитозан в наночастицы, синтезированные методом ионного гелеобразования, используя карбоксиметилхитозан и гидрохлорид хитозана (карбоксиметилхитозан и хитозана гидрохлорид – две разные водорастворимые производные хитозана с анионными и катионными свойствами соответственно). Наночастицы образуются в результате ионного процесса гелеобразования между карбоксильными группами карбоксиметилхитозана и аминогруппами хитозана гидрохлорида) [41]. Полученные наночастицы не были сферической формы, средний размер составлял 407±50 нм, содержание активного вещества и процент инкапсулирования составили 8–16% и 44–83% соответственно.

Эмульсии

Эмульсия включает в себя две несмешивающихся фазы (масло и вода), при этом одна из них диспергирована в виде мелких капель в другой [42]. Эмульсии можно разделить на два основных класса в зависимости от природы дисперсной фазы: «масло в воде», в которой капли масла диспергируют в водной фазе; и вода в масле, в которой вода образует дисперсную фазу, а масло – дисперсионная среда (рисунок 9). Для того чтобы получить стабильную эмульсию, в систему добавляют эмульгаторы или модификаторы текстуры. Такой подход может быть успешно использован для того, чтобы инкапсулировать растительные фенолы и полифенолы в эмульсию (в жидкой форме или высушенной после процесса эмульгирования для получения порошков.)

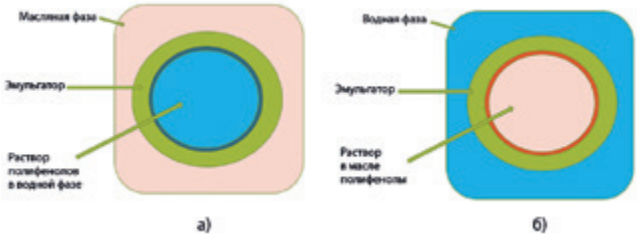


Рисунок 9. Схематическое изображение эмульсий типа «вода в масле» (W/O)– а, «масло в воде» (O/W) – б

Полифенолы, экстрагированные из виноградного сырья, были инкапсулированы в наноэмульсию, приготовленную с использованием подсолнечного или пальмового масла в качестве жидкой и твердой липидной фазы, а также в комбинации с гидрофильными и гидрофобными эмульгаторами с целью улучшения водо- и жирорастворимости этих соединений [43]. Наноэмульсию получали гомогенизацией под высоким давлением, физико-химическая стабильность изучалась ускоренными условиями хранения при различных температурах (4 °C, 30 °C и 55 °C в течение 14 дней). Результаты показали, что наноэмульсии на основе подсолнечного масла были наиболее физически и химически стабильны, они помогали избежать деградации инкапсулированных молекул, тем самым сохраняя их структурную целостность.

Везикулы

Мицеллы (рисунок 10) образуются при спонтанной сборке амфифильных полимеров в водном растворе [44], когда концентрация полимера выше критической мицеллярной концентрации (КМК). Структура ядро – оболочка характеризуется сферической фор-

мой, размеры колеблются в диапазоне от 10 до 100 нм. Гидрофобные окончания образуют центральное ядро, в то время как гидрофильные – внешнюю сферу мицеллы. После образования мицелл происходит улучшение стабильности и уменьшение полидисперсности этих структур.

Липосомы (рисунок 10) – искусственно созданные везикулы, состоящие из одного или более липидных бислоев, разделенных водными фазами. Классифицировать липосомы можно по числу ламелей (слоев), которые связываются в однослойные везикулы различных размеров и крупные многослойные везикулы, или мультивезикулярные везикулы (MBB) [26]. Разработано много методов для получения липосом, один из них – гидратация сухих фосфолипидных пленок.

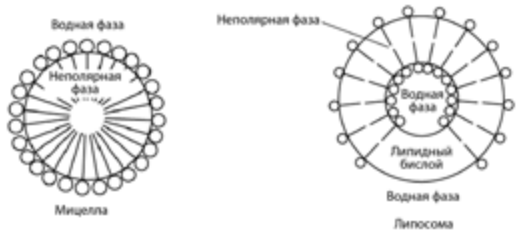


Рисунок 10. Структурная схема мицелл и липосом

Изучалось влияние мицелл и липосом на химическую стабильность пяти полифенолов [45]. Катехин-галлат, катехин, эпикатехин, эпигаллокатехина галлат и эпигаллокатехин были изготовлены в трех различных видах: молекулярный раствор, мицеллярный раствор (использовался Твин-20), липосомальная дисперсия (с использованием соевого фосфотидилхолина). По сравнению с контрольным раствором наличие мицелл и липосом уменьшило деградацию полифенолов, сохранило их структурную целостность, процесс окисления происходил медленнее по сравнению с раствором, содержащим лецитин. Особенно это было заметно в смесях гидрофобных полициклических фенолов, которые легко растворялись и связывались с мицеллами и бислоями лецитина.

Полимеризация in situ

Полимеризация in situ состоит из эмульгирования мономера (в основном винильных и акриловых соединений) в водной фазе, содержащей поверхностно-активное вещество. Происходит полимеризация, что приводит к образованию нерастворимых в воде полимерных микросфер [46].

Инкапсуляция в циклодекстрины

В настоящее время одной из наиболее важных и быстро прогрессирующих областей применения циклодекстринов и их производных является разработка адресных систем доставки лекарств в организме, поскольку активные фармацевтические субстанции в молекулярных комплексах с циклодекстринами обладают не только улучшенными фармакокинетическими параметрами, но и приобретают новые полезные свойства, повышающие их биодоступность.

Проводились исследования большого количества малорастворимых в воде полифенолов, заключённых в комплекс с циклодекстринами. Результаты показали хорошую растворимость в воде, а также увеличение антиоксидантной способности. Но в зависимости от вида полифенольного соединения и типа выбранного циклодекстрина растворимость изменялась [47]. Поэтому необходимы более длительные и обширные испытания для подбора подходящего циклодекстрина к тому или иному виду полифенола.

МЕТОД ВКЛЮЧЕНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ В СФОРМИРОВАННЫЙ ПОЛИМЕР

Полифенолы могут быть включены в полимерную матрицу двумя различными способами: «включением на месте» (in situ) и после формирования полимерной матрицы. В первом случае включение в микросферу активного вещества и образование самой микросферы происходят одновременно, а во втором случае сперва формируется матрица из полимера, а уже потом происходит поглощение активного вещества этой матрицы.

С помощью такого подхода в полимерные наночастицы (NanoCurct), состоящие из N-изпропилакриламида, винилпирролидона и акриловой кислоты, был включен куркумин [48]. Наночастицы были получены свободнорадикальной полимеризацией при 30 °C в атмосфере азота в течение 24 часов. Аммония персульфат и сульфат железа были использованы в качестве инициатора и активатора соответственно. После полной полимеризации водный раствор полимера очищали с помощью диализа, а частицы затем подвергали лиофилизации для последующего включения куркумина. В отличие от обычного куркумина куркумин в форме NanoCurct полностьюрастворим в водной среде, и исследования не показали его токсичности при введении животным .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полифенолы – биологически активные вещества, оказывающие положительное воздействие на организм человека. Эти природные молекулы характеризуются ограниченной стабильностью и растворимостью, что является следствием их низкой биодоступности. Для того чтобы преодолеть эти недостатки, разрабатываются новые перспективные способы стабилизации полифенолов.

В данном обзоре представлены пути обеспечения защиты полифенолов от таких разрушающих фак-

торов, как тепло, свет, pH, окисление, что способствует увеличению стабильности и эффективности препаратов на их основе. Наиболее перспективным способом защиты целостности структуры этих соединений без потери их активности, является инкапсуляция. Выбор материала оболочки микрокапсул имеет важное значение для обеспечения стабильности полифенолов.

Традиционные методы инкапсулирования имеют некоторые ограничения, связанные с использованием органических растворителей и поверхностно-активных веществ, а также с узким диапазоном температур и pH при проведении процессов, что может вызвать риск разрушения полифенолов. Этот комплекс проблем можно решить с помощью использования сверхкритических сред, коацервации, включения биологически активных веществ в циклодекстрины, а также другими способами. Все они в конечном итоге направлены на повышение стабильности и увеличение биодоступности препаратов на их основе.

ЛИТЕРАТУРЫ

1. J.P. Spencer, M.M. Abd El Mohsen, A.M. Minihane, J.C. Mathers. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research // Br J Nutr. 2008. № 99. P. 12.
2. I.R. Redovnikovic, K. Delonga, S. Mazor, V. Dragovic-Uzelac, M. Caric and J. Vorkapic-Furac. Polyphenolic Content and Composition and Antioxidative Activity of Different Cocoa Liquors // Czech J. Food Sci. 2009. № 5: 330–337.
3. M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, R. Masella. Polyphenols, dietary sources and bioavailability // Ann Ist super Sanita. 2007. V. 43, № 4. P. 348.
4. M. Lamprecht. Antioxidants in Sport Nutrition. © 2015 by Taylor & Francis Group, LLC, 2015.
5. S. Kuriyama; T. Shimazu; K. Ohmori; N. Kikuchi; N. Nakaya; Y. Nishino; Y. Tsubono; I.Tsuji. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: The Ohsaki study // JAMA 2006. № 296. P. 1255–1265.
6. H. Checkoway; K. Powers; T. Smith-Weller; G.M. Franklin; W.T. Longstreth Jr.; P.D. Swanson. Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake // Am. J. Epidemiol. 2002. № 155. P. 732–738.
7. T.L. Zern; R.J. Wood; C. Greene; K.L. West; Y. Liu; D. Aggarwal; N.S. Shachter; M.L. Fernandez. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress // J. Nutr. 2005. № 135. P. 1911–1917.
8. Y.J. Jeong; Y.J. Choi; H.M. Kwon; S.W. Kang; H.S. Park; M. Lee; Y.H. Kang. Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids // Br. J. Nutr. 2005. № 93. P. 581–591.
9. B. Fuhrman; N. Volkova; R. Coleman; M. Aviram. Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient (E0) mice and reduce macrophage atherogenicity // J. Nutr. 2005. № 135. P. 722–728.
10. G.P. Hubbard; S. Wolffram; R. de Vos; A. Bovy; J.M. Gibbins; J.A. Lovegrove. Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: A pilot study // Br. J. Nutr. 2006. № 96. P. 482–488.
11. J. Hallund; S. Bugel; T. Tholstrup; M. Ferrari; D. Talbot; W.L. Hall; M.Reimann; C.M. Williams; N. Wiinberg. Soya isoflavone-enriched cereal bars affect markers of endothelial function in postmenopausal women // Br. J. Nutr. 2006. № 95. P. 1120–1126.
12. J. Hodgson; K. Croft. Dietary flavonoids: Effects on endothelial function and blood pressure // J. Sci. Food Agric. 2006. № 86. P. 2492–2498.
13. M. Balu, P. Sangeetha, D. Haripriya, C. Panneerselvam. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract // Neurosci Lett 2005. V. 383(3). P. 295–300.
14. N.G. Baydar, O. Sagdic, G. Ozkan, S. Cetin. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (Vitis vinifera) seed extracts // Int J Food Sci 2006. V. 41(7). P. 799.
15. H.J. Jung, I.A. Hwang, W.S. Sung, H. Kang, B.S. Kang, Y.B. Seu, et al. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi // Arch Pharm Res 2005. V. 28(5). P. 557–60.
16. T. de Bruyne, L. Pieters, M. Witvrouw, E. de Clercq, D.V. Berghe, A.J. Vlietinck. Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols // J Nat Prod 1999. V. 62(7). P. 954–8.
17. J.H. Chávez, P.C. Leal, R.A. Yunes, R.J. Nunes, C.R.M.Barardi, A.R.Pinto, et al. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. Vet Microbiol 2006. V. 116(1-3). P. 53–9.
18. T.S. Hudson, D.K. Hartle, S.D. Hursting, N.P. Nunez, T.T.Y. Wang, H.A. Young, et al. Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms // Cancer Res 2007. V. 67(17). P. 8396–405.
19. M.C. Lazzè, R. Pizzala, F.J.G. Pecharromán, P.G. Garnica, J.M.A. Rodriguez, N. Fabris, et al. Grape waste extract obtained by supercritical fluid extraction contains bioactive antioxidant molecules and induces antiproliferative effects in human colon adenocarcinoma cells // J Med Food 2009. V. 12(3). P. 561–8.
20. L. Gamet-Payrastre, S. Manenti, M.P. Gratacap, J. Tulliez, H. Chap, B Payrastre. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase // Gen Pharmacol 1999. V. 32(3). P. 279–86.

21. T. Richard, D. Lefeuvre, A. Descendit, S. Quideau, J.P. Monti. Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation // Biochim Biophys Acta 2006. V. 1760(6). P. 951–8.
22. E-Q. Xia, G-F. Deng, Y-J.Guo, H-B. Li. Biological activities of polyphenols from grapes // Int J Mol Sci 2010. V. 11(2). P. 622–46.
23. R.R. Watson, V.R. Preedy, Sh. Zibadi. Polyphenols in Human Health and Disease, 1st Edition. Academic Press-Elsevier, 2013, 1427.
24. K.G.H. Desai, H.J. Park. Recent developments in microencapsulation of food ingredients // Dry Technol 2005. V. 23(7). P. 1361–94.
25. A. Picot, C. Lacroix. Production of multiphase water-insoluble microcapsules for cell microencapsulation using an emulsification/ spray-drying technology // J Food Sci 2003. V. 68(9). P. 2693–700.
26. A. Munin, F. Edwards-Lévy. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review // Pharmaceutics 2011. V. 3(4). P. 793–829.
27. A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, R Saurel. Applications of spraydrying in microencapsulation of food ingredients: an overview // Food Res Int. 2007. V. 40(9). P. 1107–21.
28. B.F. Gibbs, S. Kermash, I. Alli, C.N. Mulligan. Encapsulation in the food industry: a review // Int J Food Sci Nutr. 1999. V. 50(3). P. 213–24.
29. M.B. Roberfroid, N.M. Delzenne. Dietary fructans // Annu. Rev. Nut.r. 1998. V. 18 P. 117–43.
30. D. Sun-Waterhouse, S.S. Wadhwa, G.I.N. Waterhouse. Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: a comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants // Food Bioprocess Technol 2012. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11947-012-0946-y (дата обращения 31.10.2016).
31. D.P. Makris, G. Boskou, N.K. Andrikopoulos. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing // water/ethanol mixtures. Bioresource Technol. 2007. V. 98(15). P. 2963–7.
32. A. Munin, F. Edwards-Levy. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds: a Review // Pharmaceutics. 2011. V. 3. P. 793–829.
33. P. York, U.B. Kompella, B.Y. Shekunov, [ed.]. Supercritical fluid technology for drug product development // New York, Basel: Marcel Dekker, Inc., 2004. PP. 44–53, 504.
34. P.M. Gallagher, M.P. Coffey, V.J. Krukonis, W.W. Hillstrom. Gas Anti-Solvent Recrystallization of RDX; Formation of Ultra-fine Particles of a Difficult-to-Comminute Explosive // J. of Supercritical Fluids. 1992. T. 5. P. 130.
35. A. Visentin, S. Rodriguez-Rojo, A. Navarrete, D. Maestri, M.J. Cocero. Precipitation and encapsulation of rosemary antioxidants by supercritical antisolvent process // J Food Eng. 2012. V. 109(1). P. 9–15.
36. J.J. Escobar-Chavez, M. Lopez-Cervantes, A. Naik, Y.N. Kalia, D. Quintanar-Guerrero, A. Ganem-Quintanar. Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations // J Pharm Pharmaceut Sci. 2006. V. 9(3). P. 339–58.
37. S. Gouin. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends // Trends Food Sci Tech. 2004. V. 15(7-8). P. 330–347.
38. S. Xiong, L.D. Melton, A.J. Easteal, D. Siew. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel // J Agric Food Chem. 2006. V. 54(17). P. 6201–8.
39. L. Deladino, P.S. Anbinder, A.S. Navarro, M.N. Martino. Encapsulation of natural antioxidants extracted from Ilex paraguariensis // Carbohydr Polym. 2008. V. 71(1). P. 126–34.
40. T.F. Vandamme, D. Poncelet, P. Subra-Paternault. Microencapsulation: des Sciences aux Technologies. – Paris,: Lavoisier Tec & Doc, 2007.
41. J. Liang, F. Li, Y. Fang, W. Yang, X. An, L. Zhao, et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles // Coll Surf B Biointerf. 2011. V. 82 (2). P. 297–301.
42. S. Friberg, K. Larsson, J. Sjoblom. Food Emulsions. 4th ed. – New York: Marcel Dekker, 2004.
43. M. Sessa, A.A. Casazza, P. Perego, R. Tsao, G. Ferrari, F. Donsi. Exploitation of polyphenolic extracts from grape marc as natural antioxidants by encapsulation in lipid-based nanodelivery systems // Food Bioprocess Technol 2012. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11947-012-0911-9 (дата обращения 31.10.2016).
44. E. Cabane, X. Zhang, K. Langowska, CG. Palivan, W. Meier. Stimuli-responsive polymers and their applications in nanomedicine // Biointerphases. 2012. V. 7(1-4). P. 1–27.
45. I.C. Chis, M.I. Ungureanu, A. Marton, R. Simedrea, A. Muresan, I.D. Postescu, et al. Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus // Diab Vasc Dis Res. 2009. V. 6 (3). P. 200-2-004.
46. T.F. Vandamme, D. Poncelet, P. Subra-Paternault. Microencapsulation: des Sciences aux Technologies.– Paris: Lavoisier Tec & Doc, 2007.
47. М.С. Сокуренко, Н.Л. Соловьёва, С.П. Кречетов, С.А. Бруновленский-Богоявленский. Использование циклодекстринов с целью повышения биодоступности полифенольных соединений // Евразийский союз учёных. 2016. № 3(24), С. 155–156.
48. S. Bisht, M.A. Khan, M. Bekhit, H. Bai, T. Cornish, M.Mizuma, et al. A polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCurct) ameliorates CCl4-induced hepatic injury and fibrosis through reduction of pro-inflammatory cytokines and stellate cell activation // Lab Invest. 2011. V. 91(9). P. 1383–95.

УДК 615.4

1 – ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8

1 – I.M.Sechenov First Moskow State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: diomina.nb@gmail.com

СУППОЗИТОРИИ: АСПЕКТЫ МОДЕРНИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

Н.Б. Дёмина[1]*, М.Н. Анурова[1]

Резюме. В статье рассмотрены биофармацевтические аспекты суппозиториев. Показана связь особенностей ректального пути введения с биодоступностью и принципами построения рецептур лекарственной формы. Приведены сведения о влиянии физико-химических характеристик фармацевтических субстанций (ФС), основ и других вспомогательных веществ (ПАВ, пролонгаторы, циклодекстрины и др.). Приведены сведения о мукоадгезивных суппозиториях и суппозиториях с различными типами высвобождения (с немедленным интенсивным, пролонгированным). Описаны термореверсивные жидкие суппозитории (ТРЖС) на основах из полоксамеров: их свойства, принципы получения, фармацевтико-технологические и биофармацевтические показатели качества.

Ключевые слова: суппозитории, мукоадгезивные, термореверсивные жидкие суппозитории, полоксамеры.

SUPPOSITORIES: ASPECTS OF DOSAGE FORM MODERNIZATION

N.B. Diomina[1]*, M.N. Anurova[1]

Abstract. In this material were reviewed biopharmaceutical aspects of suppositories – described the relation between rectal route of administration, bioaccessibility and principles of dosage forms formulation. Also, in the article were shown the physical and chemical characteristics of API, matrix and excipients (surface-active agents, prolongation agents, cyclodextrines, etc.). Was presented information about mucoadhesive suppositories, suppositories with different types of release methods (immediate intensive or prolonged) and poloxamer-based thermo-reversible liquid suppositories (characteristics, pharmaceutical, technological and biopharmaceutical parameters of quality).

Keywords: suppositories, mucoadhesive, thermo-reversible liquid suppositories, poloxamer.

ВВЕДЕНИЕ

Суппозитории, являясь старейшей лекарственной формой, в настоящее время не теряют своей актуальности и практической значимости из-за технологичности и эффективности. Варьирование фармацевтических факторов позволяет регулировать характеристики этой лекарственной формы в нужных пределах, обеспечивая высокую терапевтическую эффективность фармацевтических субстанций (ФС) с различными физико-химическими характеристиками (растворимость, проницаемость и др.) при пути введения, альтернативном пероральному. К числу таких факторов относятся прежде всего свойства суппозиторной основы, а также наличие и содержание других вспомогательных веществ, арсенал которых в настоящее время позволяет решать различные биофармацевтические и технологические задачи.

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ТЕРАПЕВТИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СУППОЗИТОРИЕВ [1–4]

Одним из основных условий фармацевтической разработки является исчерпывающая информация о субстанции, ее физико-химических свойствах, биодоступности, стабильности и др. В суппозиториях прежде всего важны: растворимость и коэффициент распределения ФС в гидрофильной и липофильной средах, наличие полиморфизма, а для нерастворимых субстанций – размер частиц.

Коэффициент распределения является важным фактором при выборе основы суппозитория и прогнозировании высвобождения. Фармакокинетический профиль препарата непосредственно связан с растворимостью ФС в основе, или, другими словами, с коэффициентом распределения между основой и ректальной жидкостью.

Так, липофильное лекарственное вещество, распределенное в липофильной основе суппозитория, проявляет меньшую тенденцию к переходу в окружающую водную среду, чем гидрофильное вещество. А следовательно, хуже адсорбируется.

Гидрофильные основы растворимы в ректальной жидкости и вследствие этого имеют преимущество, они высвобождают как гидрофильные, так и липофильные вещества. Поэтому суппозиторная основа в настоящее время рассматривается не только как носитель ФС, она может быть использована для управления высвобождением в месте абсорбции.

На растворение и абсорбцию из суппозиториев суспензионного типа влияет размер частиц субстанции. При ректальном введении, так же как и при пероральном, скорость абсорбции ФС зависит от скорости ее растворения, которая, в свою очередь, связана с размерами частиц активной субстанции. Поэтому в случае трудно растворимых лекарственных веществ этап растворения в небольшом объеме ректальной жидкости будет лимитировать скорость абсорбции.

pH, pKa и степень ионизации молекулы лекарственного вещества взаимосвязаны и могут влиять на скорость и степень абсорбции, которая имеет тенденцию к увеличению с уменьшением степени ионизации.

Быстрота и интенсивность терапевтического эффекта суппозиториев сильно связаны с площадью поверхности ректальной слизистой, находящейся в непосредственном контакте с жидкой суппозиторной массой, содержащей лекарственное вещество. Распределение по слизистой или растекаемость можно улучшить с помощью введения в состав ПАВ. Однако только из нижней трети прямой кишки всасывание происходит в нижние геморроидальные вены, впадающие в венозную систему, минуя печень. Если растекаемость жидкой суппозиторной массы слишком высока и она достигает верхних отделов прямой кишки, всасывание лекарственного вещества осуществляется в верхнюю геморроидальную вену, откуда оно попадает через воротную вену в печень. Следовательно, в этом случае не удается избежать процессов метаболизма лекарственного вещества при первичном прохождении через печень [5]. Поэтому содержание ПАВ должно быть оптимальным.

Знания о факторах, влияющих на качество суппозиториев, стали фундаментом для создания новых типов лекарственных форм, обладающих оптимальной биоадгезией и заданными параметрами высвобождения.

Современные виды суппозиториев

Анализ данных научных публикаций показывает, что вопросы управления высвобождением ФС из суппозиториев с целью повышения терапевтической эффективности лекарственных препаратов решаются, в основном, за счет варьирования состава вспомогательных веществ и, в первую очередь, основы. В зависимости от терапевтических целей разрабатывают суппозитории с быстрым или, наоборот, замедленным высвобождением.

Суппозитории с быстрым высвобождением

Выстроить желаемый профиль высвобождения позволяют технологии создания *двухслойных суппозиториев*, внешний вид которых и специальная суппозиторная форма, предназначенная для их изготовления, показаны на рисунках 1а и 1б. Для создания внешнего слоя специальные стержни из нержавеющей стали помещают в формы при наполнении одним из компонентов (слоев) лекарственной формы, например расплавленной гидрофильной основой. После ее застывания стержни удаляют, полость внутри суппозиториев заполняют вторым слоем, которым может служить гидрофобная часть суппозитория. ФС вводят в оба слоя, что и позволяет выстраивать профиль высвобождения в желаемом диапазоне.

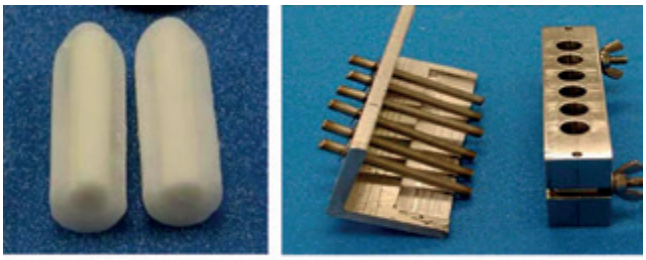


Рисунок 1. а – внешний вид двухслойных суппозиториев; б – форма для выливания двухслойных суппозиториев [6]

В работе [6] описаны двухслойные суппозитории с быстрым высвобождением, полученные методом плавления и содержащие субстанцию пропранолола (рисунок 1а). Наружный гидрофильный слой состоит из ПЭГ-4000 и ПЭГ-400 в соотношении 70:30. Внутренний слой, липофильный, состоит из сплава воска и гидрогенизированных миристиловых эфиров оливкового масла Phytowax®, имеющего температуру плавления 25 °C. В него с целью модификации высвобождения добавляли ксантановую камедь или гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ) K15 M. Активную субстанцию вводили в оба слоя.

В результате изучения высвобождения лекарственного вещества в буфер с pH 7,4 при 37 °C (аппарат 1, 25 об.) установлено, что лекарственное вещество быстро, в течение 30 мин, полностью высвобождается из слоев суппозитория, если они не содержали добавок камеди и ГПМЦ. С введением полимера высвобождение лекарственного вещества снижалось. Ксантановая камедь продлевала высвобождение эффективнее, чем ГПМЦ.

Сравнение влияния типа основы и концентрации ПАВ на профиль высвобождения и другие показатели суппозиториев приведено в работе [7]. Авторы методом плавления получали суппозитории с леводропизином (60 мг) на разных основах – гидрофильных (различные комбинации ПЭГ с разной молекулярной массой и полоксамер 188) и липофильных (Witepsol H15, Novata BCF с/без ПАВ) – и представили сравнительное изучение свойств полученных образцов, в том числе профилей высвобождения *in vitro*.

Полное высвобождение было достигнуто уже за 5 минут из суппозиториев на Witepsol H15, в которые ФС вводили в виде водного раствора, а также из суппозиториев, полученных на комбинированной основе, состоящей из 44% ПЭГ-1500, 44% ПЭГ-4000, 5% ПЭГ-400 и 7% пропиленгликоля.

Предполагая, что ПАВ будет способствовать активному выходу ФС из суппозиториев, авторы изучили влияние Tween 80 (ГЛБ 15) на высвобождение леводропропизина из липофильных основ. Показано, что при 5% содержании твина-80 в лекарственной форме полное высвобождение лекарственного вещества из Witepsol H15 и Novata BCF происходило уже за 5 мин. Авторы объясняют это увлажняющим эффектом, хорошей растекаемостью суппозиторной массы, сокращением времени распадаемости липофильных суппозиториев, что обусловлено изменением их липофильных характеристик на дифильные при добавлении ПАВ. Тем не менее дальнейшее добавление твина-80 до концентрации 10% замедляло скорость высвобождения ФС, которая полностью высвобождалась только спустя 25–30 минут. Высказано предположение, что причиной могло служить превышение ККМ и, как следствие, мицеллярное улавливание субстанции.

Суппозитории на основе полоксамера 188 (100%) показали низкую скорость растворения леводропропизина, что авторы связывают с влиянием гидрофобной части молекулы полоксамера (полиоксипропилен). Добавление пропиленгликоля (30%) в эту основу позволило получить *суппозитории с немедленным интенсивным высвобождением*, что, очевидно, связано со снижением температуры плавления, а также гигроскопичностью пропиленгликоля, которая вызвала увеличение поглощения воды и образование гидрофильной полимерной матрицы.

Суппозитории на полоксамере признаны наиболее приемлемыми для пациентов из-за низкой токсичности, отсутствия раздражающего действия, хороших характеристик высвобождения лекарственного средства.

Мукоадгезивные суппозитории

Особое внимание исследователями уделяется мукоадгезивным свойствам суппозиториев. Как уже сообщалось, терапевтический эффект лекарственных средств в этой ЛФ сильно связан с площадью поверхности ректальной слизистой, находящейся в непосредственном контакте с жидкой суппозиторной массой, а также со временем их контакта. Однако увлажненная поверхность и постоянное движение слизистой препятствуют экспозиции лекарственных веществ и способствуют их быстрому выведению из организма, что может служить причиной недостаточной биодоступности. Повысить степень всасывания ФС через слизистые оболочки возможно созданием мукоадгезивных лекарственных форм [8, 9, 10].

Авторы работы [11] получали мукоадгезивные суппозитории с противорвотным лекарственным веществом, предназначенные для амбулаторных пациентов с онкологическими заболеваниями, терапия которых сопровождается побочными эффектами, в частности тошнотой. Онкологическим пациентам назначаемые противорвотные средства вводятся либо парентерально, что требует привлечения специально обученного медицинского персонала, либо перорально, что затруднено состоянием больного. Ректальный путь введения является альтернативным и приемлемым для случаев, когда пероральное введение не представляется возможным из-за тошноты, рвоты, в бессознательном состоянии.

В суппозитории с ингибитором рвоты рамосетрона гидрохлоридом, полученные на основе Witepsol H-15, для улучшения мукоадгезивных свойств вводили Carbopol® 934P. Из-за малой дозы лекарственного вещества, которая составляла 10 мг, его диспергировали в расплавленной основе с помощью ультразвука. Изучение фармакокинетики показало, что введение в основу уже 2% Carbopol® 934P позволяет увеличить площадь под фармакокинетической кривой (24 ч) в 2,5 раза. В результате исследования противорвотной активности установлено, что разработанные суппозитории по эффективности сравнимы с инъекционной лекарственной формой.

Для получения *суппозиториев пролонгированного высвобождения* (SR) в составы лекарственной формы добавляют модификаторы вязкости, такие, например, как полимеры целлюлозы, или предварительно включают лекарственные вещества в микросферы или другие носители с последующим диспергированием в основе (12). Однако, по мнению авторов [13, 14], наиболее перспективны для получения суппозиториев с пролонгированным высвобождением ниосомы, представляющие собой двуслойные везикулы. Преимуществом этой технологии является то, что ниосомы не нужно специально получать, они образуются самопроизвольно при гидратировании определенных неионных ПАВ. Поэтому добавление таких видов неионогенных ПАВ в основы для суппозиториев может привести к получению прониосомальных структур, формирующих везикулы при гидратации. Кроме того, прониосомы могут увеличить стабильность лекарственного вещества и продлить срок годности лекарственной формы [14].

Для получения суппозиториев ретард с атенололом в работе [14] использовали различные стратегии. Первая заключалась в использовании ГПМЦ в качестве модификатора вязкости и биоадгезивного агента. Вторая – в применении прониосомальной технологии, которая обеспечивалась введением в основу не-

ионогенного поверхностно-активного СПЭН-60 с/без холестерина. Основами служили либо на гидрофильные ПЭГи, либо гидрофобный Witepsol H15.

Из-за низкого коэффициента распределения и высоких гидрофильных свойств атенолол высвобождался из обеих основ (около 100% через 4 часа). Суппозитории, содержащие Witepsol H15 с 20% ГПМЦ, так же как и суппозитории на ПЭГ с 30% ГПМЦ, обладали эффектом замедленного высвобождения. Суппозитории прониосомального типа на Witepsol (содержащие СПЭН-60), так же как и содержащие ГПМЦ, не проявляли раздражающего действия, обеспечивали медленное высвобождение и длительный антигипертензивный эффекты атенолола, превышающий эффект пероральных или ректальных лекарственных форм. Добавление холестерина приводило к увеличению скорости высвобождения атенолола из обоих типов основ.

Термореверсивные жидкие суппозитории (ТРЖС)

Обзор современных суппозиторных основ, имеющихся в арсенале производителя, свидетельствует о преобладании липофильных основ [1–3]. Гидрофильные основы представлены только тремя типами. Желатин – глицериновая основа, описанная в ведущих фармакопеях [15–17], в последние годы теряет свои производственные позиции; мыльно-глицериновая основа обладает собственным фармакологическим действием, из-за которого непригодна для введения многих ФС; основы из ПЭГ проявляют осмотическое действие. Преимущества гидрофильных основ, которые легче высвобождают как липофильные, так и гидрофильные субстанции, служат толчком для поиска новых ингредиентов, пригодных для создания гидрофильных суппозиториев для ректального и вагинального применения. Примером таких лекарственных форм могут служить ТРЖС, которые по своим физико-химическим свойствам отличаются от обычных суппозиториев.

Обычные суппозитории – твердые при комнатной температуре и расплавляются при температуре тела. Такие суппозитории при введении дают ощущение постороннего тела, вызывают дискомфорт и могут служить причиной отказа от их применения. Кроме того, из-за высокой растекаемости жидкой суппозиторной массы они могут достичь верхних отделов прямой кишки, что, как уже сообщалось, приводит к попаданию лекарственного вещества в общий кровоток и прохождению его через печень.

ТРЖС при пониженной температуре являются жидкостями, а при температуре тела превращаются в вязкий гель. Таким образом, в организм их вводят в жидкой форме, после введения в результате гелирования лекарственная форма остается локализованной в месте введения, не вытекая из ануса и не растекаясь до верхних отделов прямой кишки.

Основным компонентом основ ТРЖС, обеспечивающим их особые свойства, стали растворы полоксамеров (Pluronics), которые представляют собой неионные сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена, обрамленной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена. Наличие гидрофильной и гидрофобной частей молекулы придает этим соединениям поверхностно-активные свойства. В то же время растворы ряда полоксамеров обладают феноменом термореверсивности гелеобразования, оставаясь в виде растворов при низкой температуре (4 °C) и гелируясь при ее повышении (25–35 °C). К положительным качествам плюроников относятся индифферентность к слизистой, удовлетворительные характеристики высвобождения и совместимость с большинством ингредиентов [18, 19].

Для обеспечения мукоадгезивных свойств, оптимальных точек плавления, прочности геля и др. характеристик в составы ТРЖС включают карбопол, альгинат натрия, ГПМЦ, метилцеллюлозу (МЦ), гидроксиэтилцеллюлозу (ГЭЦ), поливинилпирролидон (ПВП) и другие полимеры.

Преимуществами ТРЖС считают оптимальные мукоадгезивные характеристики, достаточную вязкость геля, отсутствие раздражающего действия и высокую эффективность. Получены ТРЖС с высокой биодоступностью эпирубицина, диклофенака натрия, леводропропизина, хинина [20–23].

Получают ТРЖС холодным способом по методу, описанному в [24, 25].

На первом этапе к полимеру, лекарственному веществу и другим ингредиентам при непрерывном перемешивании добавляют холодную воду. Образованные смеси охлаждают до температуры 4 °C и выдерживают в течение 14–15 часов. После введения *in vivo* состав превращается в гель, так как температура гелирования ТРЖС составляет 30–37 °C.

К основным показателям качества ТРЖС относятся температура гелеобразования и прочность геля.

Температуру гелеобразования оценивают методом наклонной трубки [26]. 2 мл аликвоты геля переносят в закрытые пробирки, погружают их в водяную баню при 4 °C, затем температуру водяной бани повышают с шагом в 1 °C, оставляя уравновешиваться в течение 5 мин на каждой ступени. Фиксируют точку гелеобразования, определяя ее по неподвижности мениска при наклоне пробирки на 90 °C.

Прочность геля определяют в соответствии с методом, принятым Choi и др. [24]. 50 г жидкого суппози-

тория помещают в градуированный цилиндр объемом 100 мл и термостатируют при 37 °С для образования геля. Затем в цилиндр помещают устройство для измерения прочности геля, снабженное грузом массой 35 г. Прочность геля определяется временем в секундах, которое потребуется для погружения груза в гель на 5 см.

ТРЖС на основе полоксамеров 407 и 188 с теноксикамом предложены в работе [27]. Мукоадгезивными компонентами служили ГПМЦ или карбопол, которые также стабилизовали гель. Температура гелеобразования с ростом концентрации полоксамера 407 от 10 до 25% падала от 49,3 до 38,1 °С. Изменение концентрации полоксамера 188 в том же диапазоне приводило к снижению температуры гелеобразования от 56,99 до 45,60 °С. Введение в структуру лекарственной формы от 0,5 до 1,5% ГПМЦ также приводило к снижению температуры гелеобразования (от 46,09 до 30,11 °С), в то время, как прочность геля и биоадгезия возрастали.

Высвобождение теноксикама из ТРЖС происходило быстрее и интенсивнее, чем из суппозиториев на липофильной основе. Оптимальные составы и их характеристики приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Составы ТРЖС с теноксикамом и их характеристики [27]

Состав	Высвобождение, % за 120 мин	Прочность геля, с	Температура гелеобразования, °С
ЛВ/Р407/Р188 (1/25/10 % м/м)	100,5	21,4	34,00
ЛВ/Р407/Р188/НРМС (1/25/5/1 % м/м)	75,1	39,5	35,17

В работе [28] описаны ТРЖС карбамазепина следующего состава: карбопол 934Р 0,5% или МЦ 1,0% (мукоадгезивные компоненты), полоксамер 407 (20%) или полоксамер 188 (15%) (гелеобразователи), карбамазепин 10%, вода очищенная до 100%.

Авторы [29] использовали комплексную основу, состоящую из полоксамера и натрия альгината для создания ТРЖС, содержащих флурбипрофен. Поскольку флурбипрофен обладает невысокой растворимостью, для ее повышения предварительно получали соединения-включения с производным циклодекстрина – гидроксипропил-β-циклодекстрином (НР-β-ЦД). Для сравнения также получали образцы суппозиториев с невключенной субстанцией. Введение НР-β-ЦД в сравнении с флурбипрофеном способствовало снижению температуры гелеобразования и прочности геля, но приводило к повышению мукоадгезии. Фармакокинетические исследования ректальных суппозиториев, содержащих флурбипрофен, и суппозиториев, содержащих НР-β-CD, были выполнены на крысах в сравнении с коммерческим лекарственным препаратом Lipfen® (флурбипрофена аксетил, эмульсия для внутривенного введения). ТРЖС с НР-β-ЦД продемонстрировали значительно более высокие уровни в плазме крови, более значительную площадь под кривой и уровень максимальной концентрации флурбипрофена по сравнению с ТРЖС с немодифицированным ЛВ, показав, что флурбипрофен может хорошо всасывается в виде комплекса включения. Биодоступность ТРЖС с НР-β-ЦД сравнима с биодоступностью препарата сравнения, площадь под фармакокинетической кривой не отличалась от таковой для введенного внутривенно коммерческого препарата Lipfen®, показав перспективность предложенной технологии для разработки жидких суппозиториев, содержащих плохо растворимые в воде ФС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достижения последних десятилетий в науке и технологии, развитие индустрии вспомогательных веществ, успехи биофармации, показавшей взаимосвязь фармацевтических факторов с терапевтической эффективностью и безопасностью лекарственных препаратов, стали фундаментом для модернизации традиционных лекарственных форм. Суппозитории, успешно используемые человечеством на протяжении столетий, являются одним из объектов исследований ученых в этом направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева. Вспомогательные вещества в технологии суппозиториев и научно-методические подходы к их выбору. – Курск.: Изд-во КГМУ, 2013. 160 с.
2. Н.Б. Демина. Современные аспекты производства лекарственной формы суппозитории // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1 (12). С. 22–31.
3. J.H. Rytting, J.A. Fix. Drug Delivery: Rectal Route // Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3rd ed. / Ed. by James Swarbrick. – New York, London: PharmaceuTech, Inc. 2007, P. 1298–1311.
4. Т.В. Орлова. Исследование суппозиториев по тесту «Растворение» // Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. – М.: Перо, 2015. С. 185–219.

5. MedicalPlanet. URL: http://medicalplanet.su/farmacia/637.html (дата обращения 15.03.2016).
6. T. Phaechamud, W. Muennoom. Effect of Xanthan Gum and HPMC on Drug Liberation from Hollow-type Fast and Sustained Release Suppositories // Research Journal of Pharmaceutical. Biological and Chemical Sciences. 2015. № 4. P. 1034–1044.
7. A. Yousfan, J. Hasian. Preparation and evaluation of Levodropropizine suppositories // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2015. № 7(7). P. 274–282.
8. R.V. Keneny, C.J. Lourenco. Formulation and evaluation of thermo-reversible in situ gelling and mucoadhesive Diltiazem hydrochloride liquid suppository // International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2010. № I(I). P. 17.
9. Е.А. Киржанова, В.В. Хуторянский, Н.Г. Балабушевич, А.В. Харенко, Н.Б. Демина. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 3(8). С. 66–82.
10. Е.А. Харенко, Н.И. Ларионова, Н.Б. Демина. Мукоадгезивные лекарственные формы (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2009. № 4 (43). С. 21–29.
11. R. Yahagi, Y. Machida, H. Onishi, Y. Machida. Mucoadhesive suppositories of ramosetron hydrochloride utilizing Carbopol® // Int. Journal of Pharmaceutics. 2000. № 193. P. 205–212.
12. G. Eman, M. Mokhtar, H. El Ghamry, F. Ghazy. Sustained Release Rectal Suppositories as Drug Delivery Systems for Atenolol // Journal of American Science. 2012. № 8(12). P. 323–332.
13. M. Mokhtar, O.A. Sammour, M.A. Hammad, N.A. Megrab. Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes // Int. J. Pharm. 2008. №361(1–2). P. 104–111.
14. B. Vora, A.J. Khopade, N.K. Jain. Proniosome based transdermal delivery of levonorgestrel for effective contraception // J. Controlled Release. 1998. № 54. P. 149–165.
15. European Pharmacopoeia. 8th ed. Suppl. 8.0. – Strasburg: Europian Department for the Quality of Medicines. 2015. V. 1.
16. The United States Pharmacopeia – National Formulary. USP 38. Rockville, MD: The United States Pharmacopoeial Convention, 2015.
17. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. – М. 2015.
18. D. Ramya Devi, P. Sandhya, B.N. Vedha Hari. Poloxamer: A Novel Functional Molecule For Drug Delivery And Gene Therapy // J. Pharm. Sci. & Res. 2013. № 5(8) P. 159–165.
19. E.V. Bartrakova, A.V. Kabanov. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers // J. Control. Release. 2008. № 2(130). P. 98–106.
20. Yu-Li Lo, Yijun Lin, Hong-Ru Lin. Evaluation of Epirubicin in Thermogelling and Bioadhesive Liquid and Solid Suppository Formulations for Rectal Administration // Int. J. Molecular Sciences. 2014. № 1. P. 342–360.
21. Y.J. Park, C.S. Yong, H.M. Kim, J.D. Rhee, Y.K. Oh, C.K. Kim. Effect of sodium chloride on the release, absorption, and safety of diclofenac sodium delivered by poloxamer gel // Int. J. Pharm. 2003. № 263. P. 105–111.
22. A.A. Koffi, F. Agnely, M. Besnard, K. Brou, J.L. Grossiord, G. Ponchel. In vitro and in vivo characteristics of a thermogel-ling and bioadhesive delivery system intended for rectal administration of quinine in children // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2008. № 69. P. 167–175.
23. A. Yousfan, J. Hasian. Preparation and evaluation of Levodropropizine suppositories // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2015. № 7 (7). P. 274–282.
24. H.G. Choi, J.H. Hung, J.M. Ryu, S.J. Yoon, Y.K. Oh, C.K. Kim. Development of in-situ gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository // Int. J. Pharm. 1998. № 165. P. 33–44.
25. H.G. Choi, Y.K. Oh, C.K. Kim. In-situ gelling and mucoadhesive liquid suppository containing acetaminophen: enhanced bioavailability // Int. J. Pharm. 1998. № 165. P. 23–32.
26. 26. S.S. Pisal, A.R. Paradkar, K.R. Mahadik, S.S. Kadam. Pluronic gels for nasal delivery of vitamin B12. Part I: Preformulation study // Int. J. Pharm. 2004. № 270. P. 37–45.
27. A.S.M. Abu El-Enin, G.S. El-Feky. Formulation and Evaluation of In-situ Gelling Tenoxicam Liquid Suppositories // J. of Life Medicine. 2013. № 1(2). P. 23–32.
28. A. El-Kamel, M. El-Khatib. Thermally Reversible In Situ Gelling Carbamazepine Liquid Suppository // Drug Delivery. 2006. № 13. P. 143–148.
29. Jin-Ki Kim, Myung-Sun Kim, Jeong-Sook Park, Chong-Kook Kim. Thermo-reversible flurbiprofen liquid suppository with HP-β-CD as a solubility enhancer: improvement of rectal bioavailability // J. of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. 2009. № 64(3). P. 265–272.

УДК 615.03

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА КОМБИНИРОВАННОЙ МАТРИЦЫ НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ПЕРОРАЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ НИМЕСУЛИДА

М.Н. Анурова[1]*, Е.О. Бахрушина[1], С.П. Кречетов[2]

1 – ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

2 – Центр живых систем ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», 141700, Россия, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9, стр. 7

1 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 9/7, Institutskiy lane, Dolgoprudny, Moscow region, 141701, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: amn25@yandex.ru

Резюме. В статье представлены результаты изучения реологических характеристик экспериментальных образцов пероральных пролонгированных гелей нимесулида на основе комбинированной матрицы. Оценено влияние структурно-механических свойств гелей на высвобождение нимесулида из лекарственной формы. Обоснован состав геля с оптимальными реологическими и биофармацевтическими показателями.

Ключевые слова: ротационная вискозиметрия, пролонгированный пероральный гель, производные акриловой кислоты, тиксотропия, кривые вязкости и течения, высвобождение нимесулида из лекарственной формы.

STUDY OF THE MATRIX STRUCTURE INFLUENCE ON THE RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF NIMESULIDE ORAL GEL EXPERIMENTAL SAMPLES

M.N. Anurova[1]*, E.O. Bakhrushina[1], S.P. Krechetov[2]

Abstract. The article presents the results of the studying rheological characteristics of nimesulide oral gel experimental samples on the basis of the combined matrix. We have investigated influence of rheological properties of the nimesulide release from oral gels. We have established a gel with optimal rheological and biopharmaceutical characteristics.

Keywords: rotary viscosimetry, oral gel with prolonged release, derivatives of acrylic acid,thixotropy, curves of viscosity and flowers, drug release of nimesulide gels.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение реологических свойств является неотъемлемой частью разработки мягких лекарственных форм, так как они активно влияют на стабильность лекарственного препарата в процессе хранения, на его технологические и потребительские характеристики [1].

Вязкость – показатель, рекомендуемый для контроля качества мягких лекарственных форм в соответствии с ОФС 1.4.1.0008.15 «Мази». ГФ XIII описывает капиллярные, ротационные вискозиметры, а также вискозиметры с падающим шариком для определения данного показателя. Для достоверной оценки реологических характеристик неньютоновских жидкостей, в том числе гелей, широко применяется ротационная вискозиметрия [2]. Для изучения структурно-механических свойств в широком диапазоне вязкостей используют ротационные вискозиметры с измерительной геометрией «цилиндр в цилиндре». Для высоковязких систем, близких к упругим телам, во избежание возникновения эффекта Вайсенберга, заключающегося в наматывании изучаемого образца на ротор геометрии измерительного прибора, рекомендуется вискозиметрия с использованием геометрии «плита – плита».

Целью данной работы является изучение реологических характеристик экспериментальных образцов гелей нимесулида на основе комбинаций различных гелеобразователей.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования – экспериментальные образцы пролонгированных гелей нимесулида, представляющих собой комбинированные матричные системы с концентрацией лекарственного вещества 1% [3]. В качестве матрицеобразователя использовали полимер Kollicoat™ MAE 100 P (BASF), являющийся частично нейтрализованным сополимером метакриловой кислоты и этилакрилата (1:1). Данный полимер обладает способностью к умеренному гелеобразованию, критическая концентрация гелеобразования, согласно экспериментальным данным, составляет 20,0±0,5%. Для повышения вязкости систем в состав образцов гелей вводили модификаторы вязкости: натрийкарбоксиметилцеллюлозу

(Blanose™, Ashland), гидроксипропилметилцеллюлозу (Benecel™ nonionic K414-PH-CR, Aqualon), гидроксиэтилцеллюлозу (Natrosol™ 250 G, Ashland) и метилцеллюлозу (Bonucel™ D 1500 M, Biogrund) в концентрации 2,0%. Поскольку лекарственная форма предназначена для перорального применения, в ее состав входят корригенты органолептических свойств – аспартам 0,05% и ароматизатор «Апельсин» 0,01%, консервант – сорбиновая кислота в количестве 0,05%.

Реологические характеристики образцов изучали на ротационном вискозиметре Lamy Rheology RM 200 (Lamy Rheology, Франция) с помощью измерительных систем типа «цилиндр в цилиндре» ms-din 33 и ms-din 11 (объем ячейки 17 мл и 32 мл соответственно) при двух температурах – 20±1 °С и 37±1 °С. Динамическую вязкость рассматривали в системе «малый сдвиг – большой сдвиг – малый сдвиг» в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$, а также в диапазоне от 0 до 10 $с^{-1}$ в системе «малый сдвиг – большой сдвиг». Значения, полученные при начальных скоростях сдвига от 0 до 30 $с^{-1}$ и от 0 до 2,5 $с^{-1}$ для интервалов скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$ и от 0 до 10 $с^{-1}$ соответственно, не учитывались, как неточные, что связано с характерными для ротационной вискозиметрии инерционными эффектами [4], а также с тем, что напряжение сдвига меняется не мгновенно, а через определенные временные промежутки, установленные программным обеспечением.

Изучение высвобождения нимесулида из образцов гелей проводили на тестере растворения ERWEKA DT 600 (ERWEKA GmbH, Германия) по методике ОФС 1.4.2.0014.15 «Растворение» на аппарате 1 «Вращающаяся корзинка» с использованием двух сред: 1 час в растворе 0,1 М хлористоводородной кислоты с pH 1,2; затем в течение 6 часов в фосфатном буферном растворе с pH 7,5 с добавлением 1,5% полисорбата-80 [2]. Нимесулид относится к веществам второго класса согласно биофармацевтической классификационной системе и обладает низкой растворимостью в биорелевантных средах растворения [3]. Для таких веществ рекомендуется использование буферного раствора с pH не более 9,5 с добавлением поверхностно-активных веществ в концентрации не более 4% [4]. В работах Laís Bastosda Fonseca с соавтарами [5] было показано, что растворимость нимесулида в среде фосфатного буферного раствора с pH 6,8 в два раза меньше, чем в среде фосфатного буферного раствора с pH 7,5 (0,03 мг/мл и 0,062 мг/мл соответственно). Таким образом, в качестве второй среды для проведения теста «Растворение» использовали фосфатный буферный раствор с pH 7,5. Объем сред растворения – 800 мл, скорость вращения корзинки – 100 об/мин, температура – 37±0,5 °С. Количественное содержание нимесулида в среде растворения определяли по интенсивности поглощения растворов в УФ-области в кювете толщиной слоя 1 см при длине волны 305±2 нм для растворов с pH 1,2 и при 390±2 нм для растворов с pH 7,5 в соответствии с построенными калибровочными графиками на спектрофотометре Analytik Jena AG Specord 250 (Analytik Jena AG, Германия), программное обеспечение WinAspect (Analytik Jena AG, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гели представляют собой мягкую лекарственную форму, обладающую упруго-пластичной консистенцией и способностью сохранять форму [1, 2]. Они являются трехмерной структурой из поперечно сшитых полимеров, нерастворимых в дисперсионной среде, но набухающих путем её поглощения. Наличие структуры дает возможность говорить о гелях как о неньютоновских жидкостях. Трехмерная структура гелей определяет вязкость при напряжениях ниже предела текучести, а также саму величину предела текучести. После прохождения предела текучести (преодоления «прочности» геля) вязкость системы определяется величиной вязкости дисперсионной среды [6].

Динамическая вязкость *– приходящаяся на единицу поверхности тангенциальная сила, выраженная в паскалях, которую необходимо приложить для того, чтобы переместить слой жидкости площадью 1 $м^2$ со скоростью 1 метр в секунду, находящийся на расстоянии 1 метр относительно другого слоя, параллельно плоскости скольжения [2].*

Пластическая вязкость *– темп роста касательных напряжений сдвига при увеличении скорости сдвига, отражает вязкость раствора, экстраполированную на бесконечную скорость сдвига, исходя из математической трактовки модели Бингама или Кессона, расчетная величина [6].*

Основными реологическими характеристиками, которые могут быть оценены у неньютоновских жидкостей с помощью ротационной вискозиметрии, являются динамическая и пластическая вязкость, напряжение сдвига, скорость сдвига, предел текучести (прочность), степень тиксотропии [2]. Эти показатели целесообразно определять на различных технологических стадиях, в процессе хранения и при моделировании процесса применения лекарственной формы.

Величина диапазона скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$, соответствующая условиям производства, была рассчитана по среднему градиенту скорости сдвига, описанному в работах О.А. Тишина, В.Н. Харитонова и Е.А. Кирсанова, Ю.Н. Тимошина [7, 8]. Величина градиента зависит от объема реактора, вида перемешивающего устройства, частоты вращения и диаметра мешалки, а также плотности и структурной вязкости геля. Коэффициенты для расчета мощности перемешивания для различных типов мешалок приведены в работе «Перемешивание в жидких средах» [9]. Температура исследования, имитирующая условия производства геля, составляла 20 °С.

Диапазон скоростей сдвига от 0 до 10 $с^{-1}$ выбран для изучения поведения лекарственной формы в процессе хранения. С течением времени гель, как и любая дисперсная система, стремится к равновесию, изменяет свою микроструктуру: нековалентные связи разрушаются или перестраиваются. Однако в некоторых гелях из-за нестабильности происходят процессы ретроградации и синерезиса, реологически проявляющиеся повышением (ретроградация) или понижением (синерезис) вязкости в процессе хранения [10]. Температура, соответствующая условиям хранения, составляла 20 °С.

В процессе применении лекарственного препарата пациентом сдвиговое усилие к лекарственной форме прикладывается при экструзии из упаковки. Для пероральных гелей рассматривалась возможность применения однодозовой упаковки, дозирование из тубы в мерную ложку или с помощью шприца (рисунок 1).

Рисунок 1. Флакон темного стекла, снабженный мерным шприцем

Рассчитанная скорость сдвига в процессе экструзии укладывалась в диапазон от 0 до 10 $с^{-1}$ для всех видов упаковки [11]. Для прогнозирования поведения гелей в процессе применения структурно-механические характеристики изучали при температуре 37 °С при малых скоростях сдвига.

На первом этапе разработки пероральных пролонгированных гелей нимесулида получали образцы гелей на основе матрицеобразователя Kollicoat™ MAE 100 P в концентрациях от 5,0% до 15,0% с использованием Blanose™ в качестве модификатора вязкости.

В координатах зависимости вязкости от скорости сдвига строили кривые вязкости для экспериментальных образцов, представленные на рисунках 2–3. В обоих диапазонах скоростей сдвига наблюдается зависимость значений динамической вязкости от концентрации матрицеобразующего полимера: чем выше концентрация полимера, тем выше динамическая

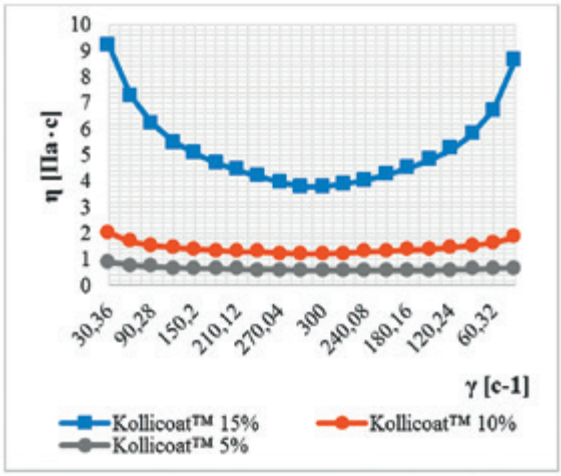


Рисунок 2. Кривые вязкости гелей на основе Kollicoat™ различных концентраций в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$ и от 300 до 0 $с^{-1}$

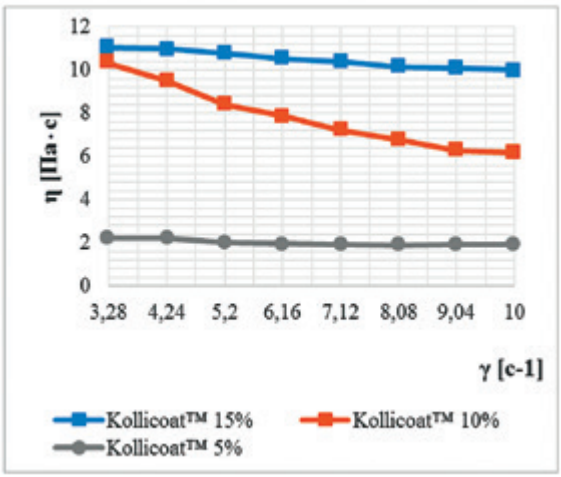


Рисунок 3. Кривые вязкости гелей на основе Kollicoat™ различных концентраций в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 10 $с^{-1}$

и пластическая вязкость. При высоких скоростях сдвига кривые вязкости для образцов с 5,0 и 10,0% содержанием Kollicoat™ MAE 100 P имеют сходный характер: динамическая вязкость незначительно меняется при разных скоростях сдвига, в то время как у образца с 15,0% концентрацией полимера вязкость постепенно падает, а затем возрастает до первоначального значения. При малых скоростях сдвига наблюдается иная картина: у образца с содержанием Kollicoat™ MAE 100 P 5,0% динамическая вязкость остается практически постоянной в данном диапазоне скоростей сдвига, а у образцов с 10,0 и 15,0% концентрацией матрицеобразователя – медленно падает.

Для матричных твердых лекарственных форм высвобождение лекарственного вещества значимо за-

висит от концентрации матрицеобразователя, а также от толщины и вязкости гидрофильного слоя, образующегося на поверхности таблетки при попадании в желудочно-кишечный тракт [12]. В связи с тем, что пролонгированные пероральные гели также являются матричными системами, представляет интерес изучение влияния реологических параметров гелей на высвобождение. Возможно, что с увеличением вязкости геля замедляется высвобождение лекарственного вещества из него [10, 13].

Из результатов теста «Растворение» описанных выше образцов видно, что прямой зависимости между вязкостью гелей и высвобождением лекарственного вещества не наблюдается (рисунок 4). При проведении теста «Растворение» составы с содержанием матрицеобразующего полимера 5,0% и 15,0% демонстрируют сходные профили высвобождения. Это можно объяснить недостаточной для 5% геля или же чрезмерной для 15,0% геля Kollicoat™ MAE 100 P плотностью структуры полимерных цепей матрицеобразователя, когда лекарственному веществу, возможно, не удается встроиться в матрицу геля. Высвобождение нимесулида из всех экспериментальных составов в кислой среде не превышало 4,0% в результате pH-зависимого растворения Kollicoat™ MAE 100 P. В среде фосфатного буферного раствора с pH 7,5 из образцов на основе Kollicoat™ MAE 100 P 5,0% за три и шесть часов эксперимента высвобождалось 87,4% и 100,0% нимесулида, из образцов на основе 10,0% Kollicoat™ MAE 100 P – 53,0% и 82,0%, из образцов с содержанием матрицеобразователя 15,0 – 83,9% и 90,3% действующего вещества соответственно. Таким образом, для дальнейшего исследования была выбрана концентрация Kollicoat™ MAE 100 P 10,0%, так как параметры высвобождения нимесулида из геля с таким количеством полимера наиболее близки к пролонгированному.

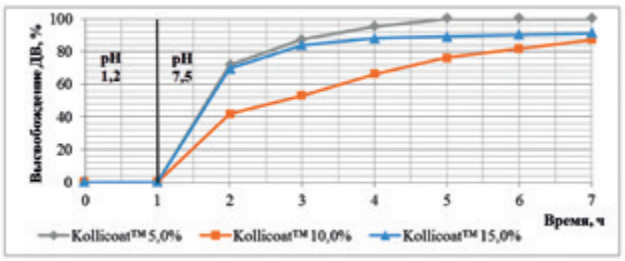


Рисунок 4. Профили растворения экспериментальных образцов пероральных гелей нимесулида на основе Kollicoat™ MAE 100 P различной концентрации

Следующим этапом исследования стал выбор модификатора вязкости для обеспечения оптимальных биофармацевтических характеристик готовой лекарственной формы. Для того чтобы объективно оценить влияние вида модификатора вязкости на реологические свойства пероральных пролонгированных гелей, были изучены структурно-механические свойства образцов монокомпонентных гелей плацебо на основе производных целлюлоз в концентрации 2,0%. Реограммы приведены на рисунке 5.

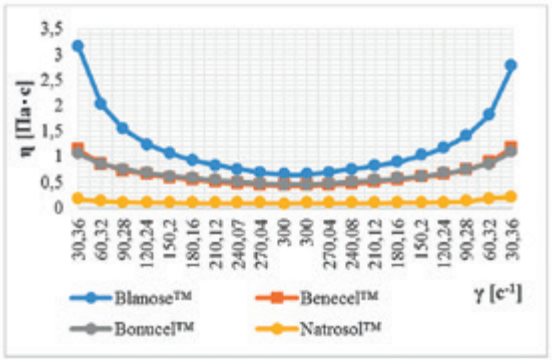


Рисунок 5. Кривые вязкости монокомпонентных гелей плацебо на основе модификаторов вязкости в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 с$^{-1}$ и от 300 до 0 с$^{-1}$

Все представленные образцы гелей целлюлоз имеют сходный вид кривых вязкости, однако пластическая вязкость образцов значимо различается в связи с различным строением полимеров. Максимальной пластической вязкостью 1,42 Па·с обладает натрийкарбоксиметилцеллюлоза марки Blanose™, минимальной (0,08 Па·с) –гидроксиэтилцеллюлоза марки Natrosol™ G 250.

Затем изучали структурно-механические свойства образцов пероральных пролонгированных гелей с использованием в качестве модификаторов вязкости изучаемых видов целлюлоз. На рисунках 6 и 7 видно,

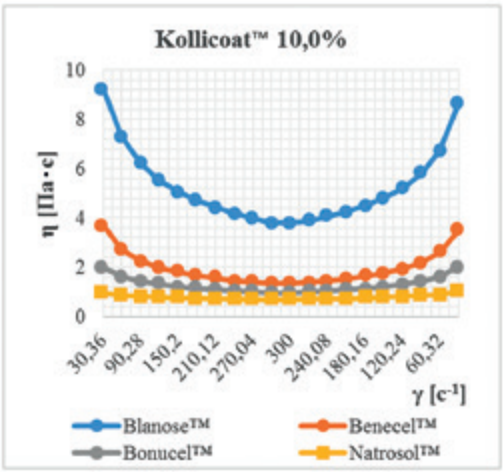


Рисунок 6. Кривые вязкости гелей на основе Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% с различными модификаторами вязкости в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 с$^{-1}$ и от 300 до 0 с$^{-1}$

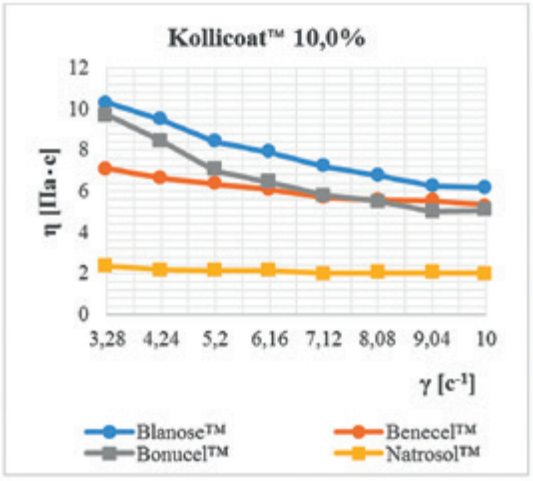


Рисунок 7. Кривые вязкости гелей на основе Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% с различными модификаторами вязкости в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 10 с$^{-1}$

что поведение гелей в диапазонах больших и малых скоростей сдвига схоже. Наибольшей пластической вязкостью обладает образец с Blanose™ (0,882 Па·с), а наименьшей – с Natrosol™ (0,36 Па·с), что соотносится с данными по изучению реологических свойств монокомпонентных гелей целлюлоз. На вязкость комбинированной матрицы наибольшее влияние оказывают модификаторы вязкости, а не матрицеобразователь – в связи с его относительно невысокой способностью к гелеобразованию.

В соответствии с моделью эксперимента изучали высвобождение нимесулида из образцов гелей на комбинированной матрице с различными модификаторами вязкости. Образец на основе Bonucel имеет наиболее высокие показатели высвобождения: за 2 ч эксперимента в раствор переходит 57,74±1,8% лекарственного вещества, а за 4 ч высвобождение достигает 100%. У образца на основе Natrosol™ высвобождение лекарственного вещества выходит на плато к 5 часу эксперимента и не превышает 75%. У образцов на основе Benecel™ и Blanose™ наблюдается постепенное высвобождение нимесулида из геля: за 2 ч в раствор переходит 39,00±1,7% и 21,17±1,5% нимесулида соответственно, за 4 часа – 66,24±1,5% и 55,91±1,6%, за 7 часов – 87,33±1,5% и 79,87±1,8%. Таким образом, удовлетворительным с точки зрения полноты и скорости можно считать высвобождение из образцов на основе Benecel™ и Blanose™. Как видно из рисунка 8, не наблюдается полного соответствия вязкости образцов и параметров высвобождения. Так, наименьшая скорость высвобождения (0,029 мкг·мин/мл за 240 мин) – у образца с наибольшей пластической вязкостью (0,882 Па·с) на основе Blanose™, максимальной скоростью растворения (0,052 мкг·мин/мл за 240 мин) обладает образец на основе Bonucel™, обладающий пластической вязкостью 0,593 Па·с, что выше, чем у образца на основе Natrosol™ (0,36 Па·с).

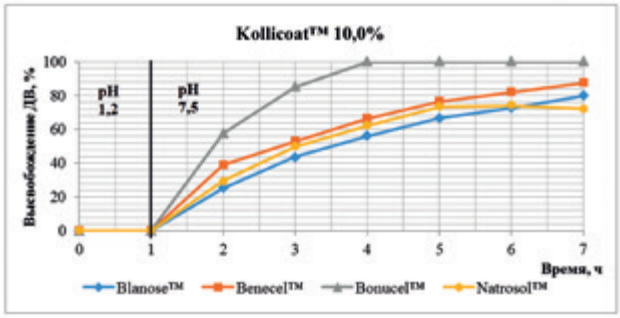


Рисунок 8. Профили растворения экспериментальных составов пероральных гелей нимесулида на основе Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% и различных модификаторов вязкости

По результатам теста «Растворение» выбрано два состава с удовлетворительными биофармацевтическими показателями, на следующем этапе исследования изучали данные образцы гелей. Для пероральных матричных систем на основе Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Benecel™ 2,0% и Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Blanose™ 2,0% строили кривые вязкости в двух температурных режимах, определяли предел текучести и вязкость по модели Кессона с целью выбора состава с оптимальными реологическими характеристиками [6, 14].

На рисунке 9 представлены кривые вязкости образца состава Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Blanose™ 2,0% в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 10 с$^{-1}$ при температурах 20 и 37 °С. Температура гелеобразования натрийкарбоксиметилцеллюлозы находит-

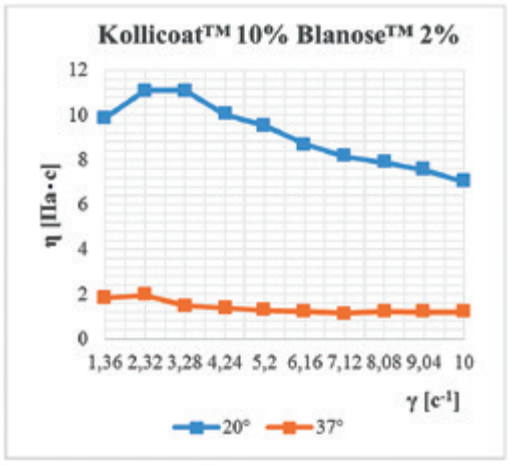


Рисунок 9. Кривые вязкости образца состава Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Blanose™ 2,0% при температуре 20 и 37 °С в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 10 с$^{-1}$

ся в интервале 20–25 °С, при повышении температуры вязкость гелей на основе данного производного целлюлозы снижается [13], что наблюдается на графике: пластическая вязкость при 20 °С составляет 2,09 Па · с, а при 37 °С – 1,23 Па · с. Вязкость образца при температуре 20 °С практически не меняется, а при 37 °С вязкость растет, а затем при скорости сдвига в 3,28 $с^{-1}$ начинает падать, что связано с достижением предела текучести геля.

Для оценки тиксотропных свойств гелей на основе комбинированной матрицы строили реограммы в условиях циклических сдвиговых деформаций («малый сдвиг – большой сдвиг – малый сдвиг»), когда структура геля сначала разрушается на нисходящей ветви диаграммы, а затем восстанавливается на восходящей части (рисунок 10). Тиксотропия – это способность мягких лекарственных форм восстанавливать свою структуру после приложения силы. Как видно из рисунка 10, вязкость данного образца постепенно снижается, а затем возрастает и достигает первоначальных значений, что говорит о высокой степени тиксотропности геля [6, 14].

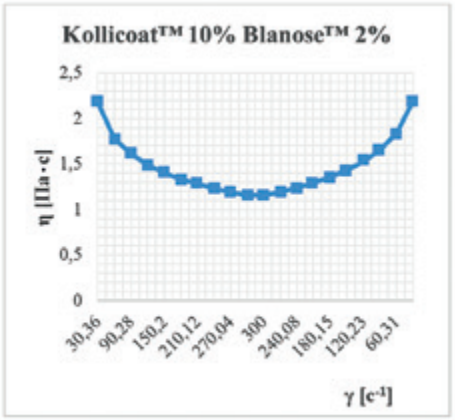


Рисунок 10. **Кривая вязкости образца состава Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Blanose™ 2,0% при температуре 20 °С в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$**

Реограмма образца Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Benecel™ 2,0%, полученная при измерении в диапазоне малых сдвиговых усилий (рисунок 11), имеет существенные отличия от предыдущего образца. При температуре 37 °С пластическая вязкость перорального пролонгированного геля более чем в два раза выше, чем при температуре 20 °С. Это обусловлено тем, что температура гелеобразования гидроксиметилпропилцеллюлозы составляет 40–50 °С [10, 13]. Из представленных диаграмм видно, что вязкость геля практически постоянна при температуре 20 °С, а при 37 °С растет в диапазоне скоростей сдвига от 1,3 до

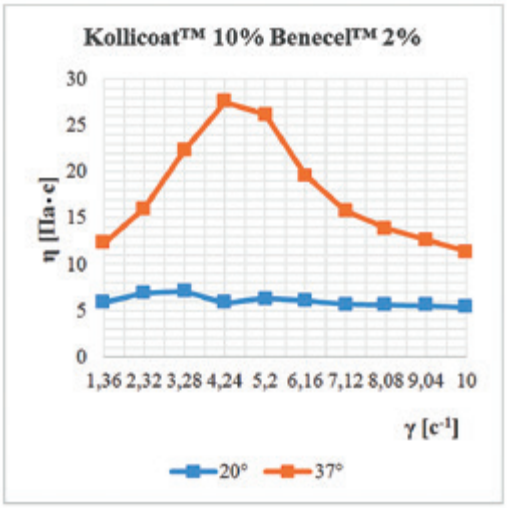


Рисунок 11. **Кривые вязкости образца состава Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Benecel™ 2,0% при температуре 20 и 37 °С в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 10 $с^{-1}$**

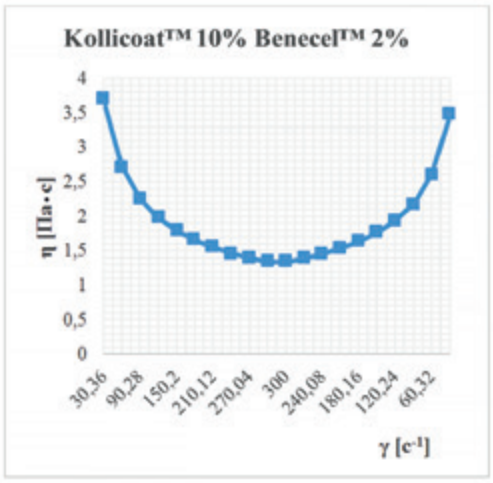


Рисунок 12. **Кривая вязкости образца состава Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Benecel™ 2,0% при температуре 20 °С в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$**

5,2 $с^{-1}$, затем снижается в связи с уменьшением прочности геля.

В диапазоне высоких скоростей сдвига образец состава Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Benecel™ 2,0% демонстрирует высокую степень тиксотропии (рисунок 12).

Для аппроксимации полученных результатов измерения зависимости вязкости от скорости сдвига была выбрана модель Кэссона [6, 14], обсчет данных проводили с помощью программного обеспечения RHEOMATIC (ver. T, LamyRheology, Франция) путем экстраполяции экспериментальных точек. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Значения пластической вязкости и пределов текучести измеряемых образцов, рассчитанные по уравнению Кэссона

Показатель / Состав комбинированной матрицы	Пластическая вязкость, Па · с	Предел текучести, Па
Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Blanose™ 2,0%	0,888	7,93
Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Benecel™ 2,0%	0,581	23,2

Как видно из таблицы 1, пластическая вязкость образцов различается не более чем в 1,5 раза, тогда как предел текучести у образца на основе гидроксиметилпропилцеллюлозы почти в три раза выше, что говорит о том, что данная система более устойчива к деформациям.

Таким образом, можно сказать, что оба выбранных образца геля нимесулида, обладающих пролонгированным высвобождением, являются высокотиксотропными и имеют выраженный предел текучести, однако более прочной структурой обладает гель на основе гидроксиметилпропилцеллюлозы, кроме того, он имеет более низкую вязкость, что обеспечивает удобство для производства и применения лекарственной формы, а также стабильность в процессе хранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены реологические характеристики экспериментальных образцов пероральных пролонгированных гелей нимесулида. Показано влияние состава комбинированной матрицы перорального геля на его структурно-механические свойства. Обоснован выбор состава с оптимальными биофармацевтическими и реологическими характеристиками – образца на основе Kollicoat™ MAE 100 P 10,0% Benecel™ 2,0%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. Быковского С.Н., проф., д.х.н. Василенко И.А., проф., д.фарм.н. Деминой Н.Б., к.фарм.н. Шохина И.Е., к.х.н. Новожилова О.В., Мешковского А.П., Спицкого О.Р. – М.: Перо, 2015. 472 с.
2. Государственная фармакопея, XIII изд. URL: https://www.rosminzdrav.ru (дата обращения 04.02.2016).
3. М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина. Разработка состава и технологии перорального пролонгированного геля нимесулида // Фармация. 2016. № 6. С. 35–39.
4. И.Е. Смехова, Ю.М. Перова, И.А. Кондратьева, А.Н. Родыгина, Н.Н. Турецкова. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 50–61.
5. L.B. da Fonseca, M. Labastie, V.P. de Sousa, N.M. Volpato. Development and Validation of a Discriminative Dissolution Test for Nimesulide Suspensions // AAPS PharmSciTech. 2009. № 10(4). P. 1145.
6. А.Я. Малкин, А.И. Исаев. Реология: концепции, методы, приложения: пер. с англ. – СПб.: Профессия. 2010. 560 с.
7. О.А. Тишин, В.Н. Харитонов. Перемешивание и быстрая химическая реакция // Сборник статей конференции «Modern problems and ways of their solution in science, transport, production and education». 17–28 июня 2014, Харьков.
8. Е.А. Кирсанов, Ю.Н. Тимошин. Место обобщенного уравнения течения среди других реологических уравнений // Жидкие кристаллы и их практическое использование. 2010. № 4(34). С. 38–47.
9. Л.Н. Брагинский, В.И. Бегачев, В.И. Барабаш. Перемешивание в жидких средах. – Л.: Химия. 1984. 520 с.
10. C.M. Ofner, C.M. Klech-Gelotte. Gels and jellies // Encyclopedia of Pharmaceutical Technolog. 3rd ed. / Ed. by J. Swarbrick. – New York: Informa Health Care, 2007. P. 1875
11. Многокомпонентные полимерные системы / Под ред. Р.Ф. Голда. – М.: Химия. 1974. 328 с.
12. Н.Б. Демина. Современные тенденции развития технологии матричных лекарственных форм с модифицированным высвобождением // Химико-фармацевтический журнал. 2016. Т. 50. № 7. С. 44–50.
13. К.В. Алексеев, И.А. Грицкова, С.А. Кедик. Полимеры для фармацевтической технологии: учебное пособие. – М.: 2011. 511 с.
14. В.Н. Матвеенко, Е.А. Кирсанов. Вязкость и структура дисперсных систем // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2011. Т. 52. № 4. С. 243–276.

Система очистки Reveleris® PREP
Флэш-хроматография и препаративная ВЭЖХ

BUCHI представляет новое поколение высокопроизводительных систем препаративной хроматографии Reveleris®. Система очистки Reveleris® PREP, объединяющая в себе возможности флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ, имеет простой, интуитивно понятный интерфейс и обеспечивает максимальное разделение и высокий выход образца.

- Простое переключение между флэш-режимом и препаративной ВЭЖХ.
- Встроенный детектор по светорассеянию (ELSD).
- Максимальная чистота благодаря синхронизации четырех сигналов детекторов (3 сигнала UV и ELSD) с помощью запатентованной технологии RevealX™.
- Быстрая настройка параметров на большом сенсорном экране 12".
- Возможность использования флэш-картриджей и препаративных колонок ВЭЖХ, а также стеклянных колонок.
- Скорость потока до 200 мл/мин в препаративном или флэш-режиме.
- Давление до 120 бар в препаративном режиме.

Дистрибьютор

Pharmcontract group of companies

+7 (495) 252-00-98
(Центральный офис в Москве)
8 (800) 333-42-24
(Бесплатный звонок по России)

www.phct.ru
info@phct.ru

www.buchi.ru

Quality in your hands

УДК 615.072

1 – ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

2 – ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

1 – Ural State Medical University, Ministry of Healthcare, 3, Repin str., Yekaterinburg, 620028, Russia

2 – Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, 19, Mira str., Yekaterinburg, 620002, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: skosyreva.nataly@mail.ru
Тел.: 8 (912) 651-21-81

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕРЕБРА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ «АРГАМИД»

Н.С. Скосырева[1]*, Н.А. Малахова[2], С.Ю. Сараева[2], О.А. Мельникова[1], А.Ю. Петров[1]

Резюме. В статье представлены данные по разработке методики количественного определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид» на основе серебряной соли сульфадимидина. За основу выбран метод роданометрического титрования с потенциометрической индикацией конечной точки. Приведены результаты валидационной оценки методики.

Ключевые слова: серебряные соли сульфаниламидных препаратов, потенциометрическое титрование, валидация.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR POTENTIOMETRIC DETERMINATION OF SILVER IN PHARMACEUTICAL SUBSTANCE «ARGAMID»

N.S. Skosyreva[1]*, N.A. Malakhova[2], S.Y. Saraeva[2], O.A. Melnikova[1], A.Y. Petrov[1]

Abstract. The article presents data on the development of an assay method of silver in pharmaceutical substance «Argamid» based on silver salt sulfadimidine. The method is based on the rhodanometric titration with potentiometric indication of the final point. The results of the validation assessment of the method are shown.

Keywords: silver salts of sulfonamides, potentiometric titration, validation.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время российский фармацевтический рынок испытывает острую потребность в эффективных лекарственных препаратах отечественного производства для лечения инфицированных ран различной этиологии. Для решения данной проблемы на базе кафедры фармации УГМУ были синтезированы серебряные соли различных сульфаниламидных препаратов, обладающие противомикробным и ранозаживляющим действием (приоритетная справка на выдачу патента № 2015153574 от 14.12.2015). Результатом данной работы должна стать разработка нормативно-технической документации на фармацевтические субстанции и лекарственные препараты на основе данных солей, включающей важный раздел с методикой определения количественного содержания действующего вещества [1]. При этом согласно [2] необходимо включать в проект ФСП на фармацевтическую субстанцию отдельную методику количественного определения серебра, входящего в состав серебряной соли.

Одним из важнейших методов количественного определения серебра является метод роданометрического титрования [3]. Детектировать конечную точку титрования (КТТ) можно двумя способами: визуально (с помощью железоаммонийных квасцов) или потенциометрически. Метод потенциометрического установления КТТ по своим возможностям превосходит титриметрические методы с применением цветных индикаторов. Он обладает большей точностью, чувствительностью, позволяет анализировать окрашенные и мутные растворы, допускает возможность дифференцированного определения веществ в одном растворе и позволяет автоматизировать процесс титрования.

Указанный способ потенциометрического титрования регламентирован для определения серебра в серебряной соли существующего сульфаниламидного препарата – сульфадиазина [2].

Однако методика имеет ряд недостатков: в качестве индикаторного электрода используют дорогостоящий серебряный металлический электрод, требуется большая (0,5 г) масса навески субстанции дорогостоящей серебряной соли и длительное время для ее измельчения и растворения без нагревания (не менее 15 мин), что повышает как стоимость рутинного анализа, так

и его продолжительность за счет длительной стадии пробоподготовки.

Целью данного исследования является разработка экспрессной методики роданометрического определения серебра с потенциометрической индикацией КТТ в синтезированных солях сульфаниламидных препаратов с заменой дорогостоящего индикаторного серебряного металлического электрода на более дешевый отечественный аналог и ее валидационная оценка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась фармацевтическая субстанция «Аргамид» на основе серебряной соли сульфадимидина (содержание серебра от 27,72% до 28,28%). Для синтеза соли использовалась субстанция сульфадимидина (ЛСР-000140/09).

В работе использовали следующие реактивы и растворы:

- азотная кислота, х.ч. (ООО «АО Реахим», Россия);
- аммоний роданистый, х.ч., массовая доля NH_4SCN не менее 99,5%, (ООО «АО Реахим», Россия).

Все растворы готовили на деионизированной воде, полученной на комбинированной мембранной установке серии ДВС-М/1НА(18)-N («Медиана-Фильтр», г. Москва, Россия).

Титрование проводилось с использованием иономера «Эксперт-рН» (ООО «Эконикс-эксперт», г. Москва, Россия) с функцией измерения ЭДС и интерфейсом RS-232 для измерения потенциала.

В качестве индикаторных были использованы: дисковый серебряный электрод (ДЭ-Ag) с диаметром диска 2 мм, кат. № 6.1204.130 (Metrohm, Швейцария), и толстопленочные электроды на основе серебросодержащей пасты ПСХП-1 (ТЭ-Ag) (ООО «НПП Дельта-пасты», г. Зеленоград, Россия), изготовленные методом трафаретной печати ООО «НПП «ЭкоБиоТест» (УрФУ, г. Екатеринбург, Россия) (рисунок 1).

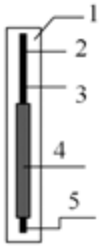


Рисунок 1. Общий вид ТЭ-Ag

1– подложка из стеклотекстолита
2 – дорожка из серебросодержащей пасты
3 – контактная зона электрода
4 – изолирующее покрытие
5 – рабочая зона электрода

Электродом сравнения служил двухключевой хлоридсеребряный электрод (Ag/AgCl/3,5M KNO_3) ЭСр-10107 (ООО «Измерительная техника», г. Москва, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке методики за основу был взят метод роданометрического определения серебра с потенциометрической регистрацией КТТ, регламентированный Фармакопеей США (USP). Согласно регламенту пробоподготовку осуществляют следующим образом: точную навеску серебряной соли сульфадиазина массой 500 мг помещают в стакан, прибавляют 150 мл воды и 50 мл 3 М азотной кислоты и растирают в течение 15 мин. Титруют потенциометрически 0,1 М раствором тиоцианата калия, используя ДЭ-Ag и двухключевой электрод сравнения [2].

Растирание указанной навески синтезированной нами субстанции «Аргамид» в растворе азотной кислоты рекомендуемой концентрации не обеспечивает полноты растворения пробы. Нагревание навески субстанции в растворе 3 М азотной кислоты на плитке при 100 °С позволило добиться полноты вскрытия пробы и сократить время пробоподготовки в 2,5 раза (5–7 мин вместо 15 мин). Однако в процессе титрования ионов серебра в растворе 3 М азотной кислоты серебряный стержень дискового индикаторного электрода подрастворяется в течение одного определения, что делает его непригодным для дальнейшего использования без дополнительной процедуры механической срезки и полировки поверхности. Помимо экономического ущерба ввиду высокой стоимости материала электрода, это существенно увеличивает время анализа. Кроме того, неконтролируемое растворение материала индикаторного электрода в процессе титрования может приводить к систематическому завышению результатов анализа.

Для оптимизации пробоподготовки масса навески дорогостоящей субстанции серебряной соли сульфадимидина была снижена в 10 раз (0,05 г). Путем последовательного растворения пробы в растворах азотной кислоты различной концентрации (от 3 моль/л и ниже) при 100 °С было установлено, что снижение концентрации азотной кислоты до 0,1 моль/л незначительно увеличивает время растворения пробы при нагревании и способствует полному растворению пробы (таблица 1). Таким образом, концентрация растворителя была снижена в 30 раз. Используемые ТЭ-Ag в подобранных условиях сохраняют рабочие характеристики в течение 5 определений, а ДЭ-Ag – в течение 3 определений при условии механической полировки поверхности.

В результате исследований была разработана следующая методика.

Около 0,05 г (точная навеска) субстанции растворяют в 15 мл 0,1 М азотной кислоты, взятой с помощью градуированной пипетки (ГОСТ 29227-91), в круглодонной колбе емкостью 50 мл. Колбу соединяют с обратным холодильником и кипятят до растворения осад-

ка (в течение 5–7 мин). При небольшой интенсивности кипения обратный холодильник обеспечивает отсутствие значимых потерь. После охлаждения раствора аликвоту 2,5 мл титруют потенциометрически 0,1 М раствором роданида калия (или роданида аммония). 1 мл 0,1 М раствора роданида соответствует 10,79 мг серебра.

Таблица 1.

Результаты оптимизации условий пробоподготовки

Концентрация раствора HNO_3, М	Результаты обработки пробы при массе навески 0,05 г и нагревании до 100 °С		Количество возможных параллельных определений на одном электроде	
	Время растворения пробы, мин	Степень растворения пробы	ДЭ-Ag	ТЭ-Ag
3,0	2–3	Полное растворение	1	1
1,5	3–5	Полное растворение	1–2	1
0,7	4–6	Полное растворение	2–3	3
0,1	5–7	Полное растворение	3	5

В субстанции «Аргамид» (серебряной соли сульфадимидина) должно быть найдено не менее 27,72% и не более 28,28% серебра.

По полученным результатам потенциометрического титрования серебра в субстанции «Аргамид» строили интегральные и дифференциальные кривые титрования (рисунок 2).

ВАЛИДАЦИЯ

Валидацию разработанной методики потенциометрического определения серебра проводили по всем требуемым характеристикам: специфичности, аналитической области, линейности, правильности, прецизионности (повторяемости) – в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [4]. Статистическая обработка полученных результатов проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [4].

Специфичность

Для подтверждения специфичности титровали растворитель – 0,1 М азотную кислоту, являющуюся «плацебо», по вышеописанной методике. Во всех опытах отсутствовал скачок потенциала, характерный для титрования серебра раствором роданида аммония, что подтверждает специфичность методики.

Линейность

Для установления линейной зависимости между количеством определяемого вещества в анализируемой пробе и расходом титранта проводили статистическую обработку выборки, полученной в результате количественного анализа навесок на девяти уровнях концентрации (в диапазоне 80–120% с шагом 5% от количества исследуемого вещества, принятого за 100%, – 0,05 г) в трех параллелях для каждой (n=27). В результате статистической обработки полученных данных (таблица 2) был построен график зависимости объема

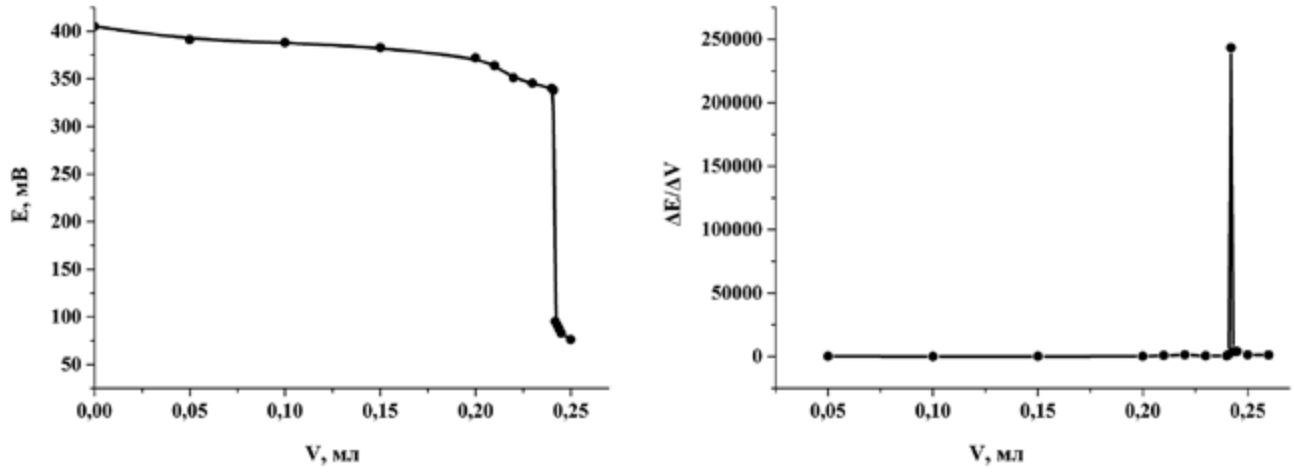


Рисунок 2. **Интегральная (1) и дифференциальная (2) кривые потенциометрического титрования раствора сульфадимидина серебра 0,1 М раствором роданида аммония**

титранта от количества исследуемого вещества (рисунок 3).

Как следует из представленных результатов, график зависимости объема 0,1 М раствора роданида аммония, затрачиваемого на титрование серебра, прямо пропорционально зависит от массы навески субстанции «Аргамид», используемой в опыте. Коэффициент корреляции – более 0,99.

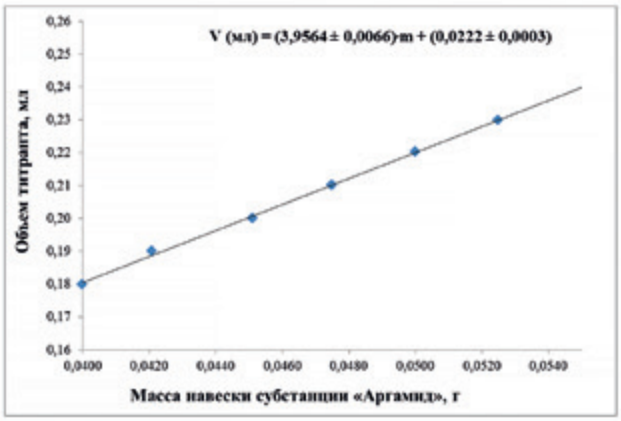


Рисунок 3. График линейной зависимости объема 0,1 М раствора роданида аммония от массы субстанции «Аргамид»

Таблица 2.

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости y=bx+a

Статистические характеристики	Результаты
Уравнение прямой	y=3,9564x+0,0222
Угловой коэффициент линейной зависимости (*b*)	3,9564
Свободный член линейной зависимости (*a*)	0,0222
Среднее значение массы навески, г	0,0500
Среднее значение объема титранта , мл	0,22
Табличное значение критерия Стьюдента $t_{табл}$ (P=95%, f=n–2=25)	2,06
Доверительный интервал Δ*a*	0,0003
Доверительный интервал Δ*b*	0,0066
Дисперсия s_0^2	0,00000019
Коэффициент корреляции *r*	0,9997

Правильность

Исследовались растворы 3 концентраций (80, 100 и 120%) в 3 параллелях для каждой (n=9). Оценка проводилась путем расчета процента определения известной концентрации (отклик), стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ, относительное стандартное отклонение среднего результата) и доверительного интервала среднего значения (таблицы 3, 4).

Таблица 3.

Результаты установления правильности методики

Уровень концентрации, %	Навеска субстанции «Аргамид», г	Объем титранта, мл	Найденное содержание серебра, %	Отклик, %
80	0,0401	0,17	27,90	99,64
	0,0401	0,17	27,91	99,68
	0,0402	0,18	28,06	100,22
100	0,0502	0,22	28,00	100,00
	0,0501	0,22	28,04	100,14
	0,0503	0,22	28,06	100,21
120	0,0602	0,26	27,89	99,61
	0,0603	0,26	27,92	99,70
	0,0604	0,26	27,93	99,75

Таблица 4.

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении правильности (P=95%)

Статистические характеристики	Результаты
Среднее значение, %	99,88
Стандартное отклонение	0,26
КВ, %	0,09
Нижняя граница доверительного интервала среднего результата, %	99,68
Верхняя граница доверительного интервала среднего результата, %	100,08

Как видно из таблицы 4, коэффициент вариации составляет менее 2,0%. Среднее значение составило 99,88% и находится внутри регламентированного диапазона 99–101% [4, 5]. Доверительный интервал среднего результата анализа включает 100%-е значение.

Прецизионность [повторяемость (сходимость)]

Для оценки прецизионности проводили оценку 6 проб при 100%-й концентрации действующего вещества (n=6). Полученные результаты представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5.

Результаты установления повторяемости (сходимости) методики

Обозначение пробы	Навеска субстанции «Аргамид», г	Объем 0,1 М NH_4SCN, мл	Найденное содержание серебра, %
Проба 1	0,0496	0,22	27,78
Проба 2	0,0499	0,22	27,87
Проба 3	0,0498	0,22	27,93
Проба 4	0,0501	0,22	28,02
Проба 5	0,0502	0,22	27,96
Проба 6	0,0503	0,22	28,03

Таблица 6.

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении повторяемости (сходимости)

Статистические характеристики	Результаты
Наименьшее значение, %	27,78
Наибольшее значение, %	28,03
Среднее значение $\bar{x}$, %	27,93
Стандартное отклонение среднего результата	0,094
КВ, %	0,14
Граничные значения доверительного интервала среднего результата ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$)	27,93±0,10

Коэффициент вариации менее 1,5% (при n=6).

Аналитическая область методики

В рамках выбранного диапазона концентраций (от 80 до 120%) была доказана правильность, прецизионность и линейность методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана экспрессная методика количественного определения серебра в фармацевтической субстанции «Аргамид» методом роданометрического титрования с потенциометрической индикацией КТТ. Обоснованность методики подтверждена результатами определения таких валидационных характеристик, как специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность. Для каждого из выполненных тестов получены положительные результаты. Данная методика может быть рекомендована к включению в нормативно-техническую документацию для контроля качества разрабатываемого лекарственного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Правила составления, изложения и оформления стандартов качества на фармацевтические субстанции: Методические рекомендации. – М. 2009. 68 с.
2. Фармакопея США: USP 29; Национальный формуляр: NF24: в 2 т.: пер. с англ. Т. 1. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 1720 с.
3. И.В. Пятницкий, В.В. Сухан. Аналитическая химия серебра. – М.: Наука. 1975. 264 с.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII издание: в 3 т. – М.: ФЭМБ, 2015.
5. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. В.В. Береговых. – М.: Литерра, 2008. 132 с.

Автоматический тестер **Pharmatron AutoTest 4**

- Тестирование гораздо большего числа таблеток различной формы: до 12 серий образцов
- Система SmartRake™ в комбинации с ленточным устройством подачи образцов – гарантия правильной ориентации каждого образца на протяжении всего теста
- Предельная точность результатов: твердость, масса, длина/диаметр, ширина и толщина
- Беспримерная гибкость моделирования процесса

Тестер Auto Test 4 внесен в Государственный реестр средств измерения Свидетельство СН.С.28.072.А № 58664 от 19.05.2015 г.

КАЧЕСТВО
ИМЕЕТ ЗНАЧЕНИЕ!

pharmatron
Dr. Schleuniger®

Полуавтоматический тестер прочности таблеток **Pharmatron SmartTest 50**

- Полуавтоматический анализ 5 параметров таблеток любой формы: масса, толщина, ширина, диаметр/длина и твердость
- Технология измерения твердости Dr. Schleuniger® обеспечивает стабильно точные результаты
- Система SmartAlignTM – гарантия точной ориентации образцов и автоматический поворот таблеток
- Тестирование до 23 образцов за 1 исследование
- Соответствует USP и EP, CE и EMC

Pharmatron ST50 внесен в Государственный реестр средств измерения Свидетельство СН.С.28.072.А № 58664 от 19.05.2015 г.

Pharmaceutical® Solutions

ООО «Фармацевтические решения» — эксклюзивный представитель Sotax и Pharmatron на территории Российской Федерации

115114, Россия, г. Москва, Дербеневская наб., 7/2, оф. 429

+7 (495) 648-32-60,
8 (800) 333-70-32

www.pharmsolutions.ru
info@pharmsolutions.ru

УДК 615.454.1;
615.847.8;
542.953

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ И МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА МАГНИТНЫХ ЛЕЧЕБНЫХ СРЕДСТВ (МАГНИТНЫХ МАЗЕЙ, МАГНИТНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ, ЖЕЛЕЗОУГЛЕРОДНОГО КОМПОНЕНТА ДЛЯ КРИОХИРУРГИИ)

Ю.Я. Харитонов[1], О.Г. Черкасова[1], С.П. Завадский[1]*, Е.Ю. Шабалкина[1], И.И. Краснюк (мл.)[1], В.Ю. Григорьева[1], С.Н. Цыбусов[2], Е.А. Абизов[1]

1 – ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

2 – ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» (НижГМА), 603950, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

1 – I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1, Minin & Pozharskiy sq., Nizhny Novgorod, 603005, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: argus78@bk.ru

Резюме. Разработаны экспериментальные критерии оценки и контроля качества магнитных лечебных мазей, магнитных суппозиториев (с новокаином, ортофеном), железоуглеродного композита (активного компонента теплопроводящих сред для магнитоуправляемой теплопередачи в криохирургии). Критерии оценки и контроля качества необходимы для обеспечения аналитического сопровождения производства магнитных наполнителей и магнитных лекарственных форм. Это позволяет осуществлять технологический и фармакопейный контроль качества.

Ключевые слова: магнитные мази, суппозитории, железоуглеродный композит для криохирургии.

DEVELOPMENT OF THE PROCEDURES OF QUALITY CONTROL OF MAGNETIC MEDICATIONS (MAGNETIC MEDICAL OINTMENTS, MAGNETIC SUPPOSITORIES, IRON-CARBON COMPOSITE FOR THE CRYOSURGERY)

Yu. Ya. Kharitonov[1], O.G. Cherkasova[1], S.P. Zavadskiy[1]*, E.Yu. Shabalkina[1], I.I. Krasnyuk (jr.)[1], V.Yu. Grigorjeva[1], S.N. Tsybusov[2], E.A. Abizov[1]

Abstract. The experimental tests for quality control of magnetic medical ointments, magnetic suppositories (with procaine, diclofenac), iron-carbon composite (active ingredient of heat conductivity systems for the magnetic control heat transference in the cryosurgery) have been developed.

Keywords: magnetic ointments, suppositories, iron-carbon composite for cryosurgery.

СТАТЬЯ ПРИВЕДЕНА В АВТОРСКОЙ РЕДАКЦИИ

ВВЕДЕНИЕ

В арсенале современных магнитных лекарственных форм [1–5] перспективное место занимают магнитные мази [6–8], магнитные суппозитории [9–12], магнитные композиты для криохирургии [13–15], магнитоуправляемые липосомы [16]. Однако их дальнейшее широкое применение в практическом здравоохранении сдерживается отсутствием в ряде случаев надежных экспериментальных аналитических критериев оценки и контроля качества магнитных лечебных средств, особенно тогда, когда эти лечебные средства одновременно содержат как магнитный компонент (магнитный наполнитель), так и лекарственную субстанцию.

Цель комплекса исследований, результаты которых охарактеризованы в данном сообщении, состояла в разработке методик экспериментального аналитического контроля качества магнитных лечебных средств – магнитных мазей, магнитных суппозиториев, магнитного железоуглеродного композита (компонента теплопроводящих сред для магнитокриовоздействия в хирургии).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались следующие методы исследования и анализа: химический анализ (реакции подлинности, гравиметрия, титриметрия), спектрофотометрия в УВИ-области спектра, определение магнитных свойств – магнитной индукции для магнитных суппозиториев и намагниченности насыщения для магнитных мазей, методы контроля качества лекарственных субстанций и лекарственных форм, предусмотренные фармакопейными требованиями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общие указания по критериям и методам контроля качества магнитных мазей

Магнитные мази – мягкая лекарственная магнитная форма, предназначенная для нанесения на кожу, рану, слизистую оболочку, для введения в наружные свищи. Магнитные мази при лечении предполагают взаимодействие с внешним источником постоянного магнитного поля (ПМП).

Магнитные мази состоят из основы, одного или нескольких лекарственных веществ, равномерно в ней распределенных, и магнитного наполнителя. В роли последнего чаще всего используют магнетит. Методы лечения с использованием магнитных мазей имеют ряд преимуществ по сравнению с уже известными методами лечения в различных областях медицины [6–8, 17].

Критерии контроля качества магнитных мазей включают как критерии качества традиционных мазей, так и дополнительные критерии, характеризующие их магнитные свойства. Специфическим магнитным критерием магнитных мазей с магнитомягкими магнитными наполнителями является намагниченность насыщения (I_s). Намагниченность насыщения – максимальная намагниченность, которая достигается в сильных полях, когда все магнитные моменты доменов ориентированы вдоль магнитного поля. Намагниченность насыщения – критерий качества, характеризующий способность магнитных мазей взаимодействовать с внешним источником магнитного поля, что обеспечивает их терапевтическое действие [6–8].

Магнитные мази хранят в холодильнике при температуре около +5 °С. Стабильность мазей при хранении в данных условиях на протяжении 2 лет доказана в экспериментальных исследованиях [18, 19].

Общие указания по критериям и методам контроля качества магнитных суппозиториев

Магнитные суппозитории (МС) – твердая при комнатной температуре и расплавляющаяся либо растворяющаяся до вязкой массы при температуре человеческого тела (36–37 °С) лекарственная форма. Отличие МС от традиционных немагнитных суппозиториев заключается в присутствии в МС магнитного наполнителя. Магнитный наполнитель придает МС после намагничивания свойства источника ПМП.

Для проведения контроля качества МС используются критерии качества традиционных суппозиториев и дополнительные критерии, присущие только МС. Контроль качества МС проводят по следующим показателям: твердость, средняя масса, температура плавления, время полной деформации (для МС на липофильных основах), время растворения (для МС на гидрофильных основах), экспозиция МС как источника ПМП, однородность, качественный анализ лекарственного вещества в МС, количественный анализ лекарственного вещества в МС, качественный анализ магнитного наполнителя в МС, количественный анализ магнитного наполнителя в МС, максимальное значение магнитной индукции вблизи полюсов МС, соответствие требованиям ГФ XIII изд. на микробиологическую чистоту [20] и по другим показателям, если таковые включены в фармакопейные статьи по соответствующим суппозиториям.

Критерии качества по показателям твердость, средняя масса, температура плавления являются общими как для магнитных, так и для традиционных суппозиториев; для их оценки используются общепринятые методы контроля качества, приведенные в статье ГФ XIII изд. «Суппозитории» [21].

Суппозитории должны обладать твердостью, обеспечивающей удобство их применения.

Среднюю массу МС определяют взвешиванием 20 суппозиториев с точностью ±0,01 г. Отклонение в массе суппозиториев не должно превышать ±5 % и только два суппозитория могут иметь отклонение ±7,5%.

Температуру плавления определяют для суппозиториев на липофильных основах по методу 2а (ГФ XI, вып. 1, с. 18); температура плавления не должна превышать 37 °С, если нет других указаний.

Экспозиция – порядка 15 минут (время полной деформации для МС на гидрофобных основах) [21].

Суппозитории в каждой упаковке должны иметь одинаковую форму, коническую или торпедообразную [21].

Однородность МС определяют визуально на продольном срезе по отсутствию вкраплений. На срезе допускается наличие воздушного стержня или воронкообразного углубления.

Определение количественного содержания и (при необходимости) однородность дозирования фармакологически активных веществ (для МС с лекарственными веществами) должны быть описаны в фармакопейных статьях для соответствующих МС.

Качественный и количественный анализы магнитного наполнителя являются специфическим критерием качества МС и проводятся в соответствии с указаниями для магнитных наполнителей.

Консерванты, входящие в состав МС, должны обеспечивать соответствие требованию ГФ по микробиологической чистоте, категория 3 [20].

Максимальное значение магнитной индукции вблизи полюсов МС является специфическим критерием качества МС и может колебаться от 10 до 50 мТл. Данный показатель определяет терапевтическое действие МС. Контролируется с помощью датчика миллитеслаамперметра на поверхности МС. С целью измерения магнитной индукции на поверхности МС

можно использовать, например, миллитеслаамперметр М494, ГОСТ 8711-60. Для этих целей может также применяться любой официально утвержденный миллитеслаамперметр. Фиксируется наибольшее зачение магнитной индукции на поверхности МС. Измеряется в теслах (Тл) или миллитеслах (мТл).

Требование ГФ по микробиологической чистоте определяется в соответствии со статьей ГФ XIII изд. «Микробиологическая чистота» [20].

Ниже охарактеризованы критерии и методы контроля качества магнитных ректальных суппозиториев с новокаином и ортофеном.

Критерии и методы контроля качества магнитных ректальных суппозиториев с новокаином

Состав на один суппозиторий

Бария феррит – 2,6 г.

Новокаин – 0,1 г (ГФ X, с. 467-468 или более поздняя НД).

Суппозиторная основа (витепсол H_{15}, ВТУ № 3–70 или более поздняя НД) – 1,8 г.

Описание. Суппозитории одинаковой формы, черного цвета со слабым специфическим запахом.

Средняя масса. Определяют взвешиванием (с точностью ±0,01 г) не менее 10 суппозиториев. Отклонение в массе суппозиториев от средней массы определяют взвешиванием каждого суппозитория с минимальной выборкой 5 суппозиториев.

Допустимое отклонение от средней массы не должно превышать ±5% от регламентируемого (4,5 г).

Подлинность

А. Подлинность по новокаину

Определение подлинности по новокаину проводят в отсутствие феррита бария. Около 4,5 г (точная навеска одного суппозитория) помещают в сухую плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют около 150 мл воды. Содержимое колбы нагревают на кипящей водяной бане до полного расплавления основы, тщательно перемешивают. Затем нагревание продолжают еще 5 мин, периодически встряхивая содержимое колбы. Далее колбу охлаждают, полученную водную фазу фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента» в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем раствора в колбе до метки водой (раствор *А*); при этом магнитную фазу удерживают на дне колбы с помощью постоянного магнита, обладающего значением магнитной индукции на поверхности не менее 300 мТл – колбу помещают сверху постоянного магнита.

С раствором *А* проводят следующие качественные реакции.

1) На первичную аминогруппу (ГФ XI, с. 743).

2) На хлориды (ГФ XI, с. 747).

3) Реакция на сложноэфирную группу. К 2 мл раствора *А* прибавляют 2 мл щелочного раствора гидроксиламина, встряхивают 5 минут, прибавляют 2 мл разведенной хлороводородной кислоты и 0,5 мл 10%-го раствора хлорида железа(III). Наблюдается вишневое окрашивание раствора.

4) Частная реакция на новокаин. При добавлении к 2 мл раствора *А* 2 мл раствора NaOH выделяется новокаин – основание, представляющее собой бесцветный маслянистый осадок.

Б. Подлинность по ферриту бария

Анализ проводится при отсутствии новокаина. Феррит бария, удерживаемый на дне колбы с помощью постоянного магнита, отделяют от раствора, растворяют в смеси азотной и хлороводородной кислот (1:3) при нагревании. Полученный раствор дает характерные реакции на катионы бария и железа(III) (ГФ XI, вып. 1, с. 175).

В ИК-спектре поглощения феррита бария (таблетки в KBr или суспензия в вазелиновом масле) в области 400–4000 $см^{-1}$ проявляются характерные широкие полосы около 450 и 600 $см^{-1}$.

Температура плавления. Не выше 37 °С (ГФ XI, вып. 1, с. 18, метод 2б).

Время полной деформации. Не более 40 мин (ГФ XI, вып. 2, с. 153).

Максимальное значение магнитной индукции на поверхности суппозитория. От 20 до 25 мТл (изотропные); от 10 до 45 мТл (анизотропные). Методика определения приведена в разделе «Общие указания по критериям и методам контроля качества магнитных суппозиториев».

Экспозиция. Не более 15 минут (время полной деформации для МС на гидрофобных основах) [21].

Количественное определение

1) *Новокаин.* Около 4,5 г (точная навеска одного суппозитория) помещают в сухую плоскодонную колбу вместимостью 250 мл и прибавляют 150 мл воды (дальнейшие действия указаны выше в разделе «Подлинность»).

Аликвотную долю раствора *А* объемом 2 мл переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем раствора в колбе до метки водой (раствор *Б*). Оптическую плотность раствора *Б* измеряют на спектрофотометре при длине волны 290 нм.

Концентрацию новокаина в растворе определяют по градуировочному графику либо с использованием стандарта. Содержание новокаина в граммах (X) в одном суппозитории вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot M \cdot 12{,}5}{\varepsilon \cdot l},$$

где *X* – масса новокаина (г); *M* – молярная масса новокаина (272,78 г/моль); *l* – толщина поглощающего слоя (см); ε – молярный коэффициент погашения (16500 л · моль$^{-1}$ · см$^{-1}$). Содержание новокаина должно быть от 0,090 до 0,110 г.

2) *Феррит бария.* После растворения навески бария феррита в смеси концентрированных хлороводородной и азотной кислот (3:1) при нагревании определяют количественное содержание бария и железа. Содержание бария феррита должно быть от 2,34 до 2,86 г.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии со статьей ГФ XIII «Микробиологическая чистота» [20].

Упаковка, маркировка и транспортирование указываются в соответствующей фармакопейной статье.

Хранение. Список Б, в сухом, защищенном от света месте при пониженной температуре.

Срок годности. 2 года. Стабильность магнитных ректальных суппозиториев с новокаином на протяжении 2 лет в холодильнике при температуре +5 °С доказана в экспериментальной работе [22].

Фармакологическое действие. Местное обезболивающее, противовоспалительное средство.

Критерии и методы контроля качества магнитных ректальных суппозиториев с ортофеном

Состав на один суппозиторий

Феррит бария – 2,6 г.

Диклофенак натрия (ортофен) – 0,05 г (ГФ X, с. 467–468 или более поздняя аналогичная НД).

Суппозиторная основа: витепсол H_{15}, ВТУ № 3–70 или более поздняя аналогичная НД – 1,8 г.

Описание. Суппозитории одинаковой формы в одной и той же упаковке, черного цвета, со слабым специфическим запахом.

Средняя масса. Определяют взвешиванием (с точностью до 0,01 г) не менее 10 суппозиториев. Отклонение в массе суппозиториев от средней массы определяют взвешиванием каждого суппозитория с минимальной выборкой 5 суппозиториев. Допустимое отклонение от средней массы не должно превышать ± 5% от регламентируемого (4,45 г).

Подлинность

А. Подлинность по ортофену

Определение подлинности по ортофену проводят в отсутствие бария феррита. Около 4,45 г (точная навеска одного суппозитория) помещают в сухую плоскодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 150 мл воды. Содержимое колбы нагревают на кипящей водяной бане до полного расплавления основы, тщательно перемешивают. Затем нагревание продолжают еще 5–7 мин, периодически встряхивая содержимое колбы. Далее колбу охлаждают, полученную водную фазу фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента» в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объем раствора в колбе до метки водой; при этом магнитная фаза удерживается на дне колбы с помощью постоянного магнита. Получают раствор *А*. С раствором *А* проводятся качественные реакции.

1) Реакция выделения нерастворимого осадка из растворов натриевых солей. При прибавлении разведенной кислоты хлороводородной выпадает белый осадок.

2) На хлориды (ГФ XI, с. 747).

3) Реакции солеобразования ортофена.

К отдельным частям раствора А прибавляют по несколько капель 2%-го раствора нитрата серебра (выпадает белый осадок); 3%-го раствора хлорида железа(III) (образуется желто-коричневый осадок); 10%-го раствора сульфата меди(II) (выделяется светло-зеленый осадок).

Б. Подлинность по ферриту бария

Анализ проводится в отсутствие диклофенака натрия. Феррит бария, удерживаемый постоянным магнитом на дне колбы, отделяют от раствора, растворяют в смеси концентрированных хлороводородной и азотной кислот (3:1) при нагревании. Полученный раствор дает характерные реакции на катионы бария и железа(III).

В ИК-спектре поглощения феррита бария (таблетки в KBr или суспензия в вазелиновом масле) в области 400–4000 см$^{-1}$ проявляются характерные широкие полосы около 450 и 600 см$^{-1}$.

Температура плавления. Не выше 37 °С (ГФ XI, вып. 1, с. 18, метод 2б).

Время полной деформации. Не более 40 мин (ГФ XI, вып. 2, с. 153).

Экспозиция. Не более 15 минут (время полной деформации для МС на гидрофобных основах) [21].

Максимальное значение магнитной индукции на поверхности суппозитория. От 20 до 25 мТл (изотропные); от 10 до 45 мТл (анизотропные).

Количественное определение

1) *Диклофенак натрия.* Точную навеску суппозитория помещают в сухую плоскодонную колбу с притертой пробкой объемом 100 мл. Содержимое колбы нагревают до полного расплавления на кипящей водяной бане, вращая колбу рукой. К полученной массе добавляют 50 мл водно-этанольной смеси (1:1). Содержимое колбы снова нагревают на водяной бане при осторожном перемешивании, вращая колбу рукой до растворения основы. Охлаждают в струе холодной воды, фильтруют через сухой складчатый фильтр «белая лента» в

сухую колбу (магнитную фазу удерживают в плоскодонной колбе постоянным магнитом, В=300 мТл), отбрасывая первые 25 мл фильтрата. Получают раствор *А*. 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 1,5 мл 95%-го этанола, 5 мл 0,1 моль/л раствора NaOH, доводят объем раствора до метки дистиллированной водой и перемешивают, вращая колбу рукой; получают раствор *В*.

Измеряют оптическую плотность раствора *В* относительно раствора сравнения. Параллельно определяют оптическую плотность раствора рабочего стандартного образца (РСО) ортофена относительно того же раствора сравнения.

Приготовление раствора РСО. Точную навеску ортофена (около 50 мг) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 5 мл 95%-го раствора этанола, после растворения доводят раствор этанолом до метки и перемешивают, вращая колбу рукой. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 5 мл 0,1 моль/л раствора NaOH, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Получают раствор РСО. 1,0 мл РСО содержит около 0,00002 г ортофена. Содержание *X* ортофена вычисляют в граммах по формуле:

$$X=A \cdot m/A_o,$$

где А – оптическая плотность исследуемого раствора, A_o – оптическая плотность раствора РСО, *m* – масса навески ортофена, взятая для приготовления РСО, г.

2) *Феррит бария.* После растворения отделенной массы гексаферрита бария в смеси концентрированных хлороводородной и азотной кислот (3:1) при нагревании определяют барий гравиметрически (в виде сульфата бария) или сульфатометрическим титрованием (с металлохромными индикаторами нитхромазо и ортаниловым А). Железо определяют либо гравиметрически, либо титриметрически (перманганатометрически, дихроматометрически, йодиметрически). Содержание бария феррита в одном суппозитории может быть от 2,34 до 2,86 г.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии со статьей ГФ XIII «Микробиологическая чистота» [20].

Упаковка, маркировка и транспортирование указываются в соответствующей фармакопейной статье.

Хранение. Список Б, в холодильнике при температуре +5 °С.

Срок годности. 2 года. Стабильность магнитных ректальных суппозиториев с новокаином на протяжении 2 лет в холодильнике при температуре +5 °С доказана в экспериментальной работе [23].

Фармакологическое действие. Противовоспалительное средство.

Железоуглеродный композит

Проведенные нами исследования (с учетом имеющихся литературных данных) позволили сделать экспериментально обоснованный выбор в пользу железоуглеродного композита как компонента теплопроводящих сред для магнитокриовоздействий и разработать критерии и нормы оценки его качества, охарактеризованные в таблице 1.

Таблица 1.

Характеристика и нормы показателей качества порошка железоуглеродного композита

Наименование показателей качества	Характеристика и нормы показателей качества порошка железоуглеродного композита
Описание	Пудра черного цвета без запаха, легко притягивается магнитом
Растворимость	Практически нерастворим в воде, 95%-м этиловом спирте, хлороформе, эфире
Родственные магнитные примеси, нерастворимые в минеральных кислотах	При растворении порошка в минеральных кислотах и удалении углерода остается нерастворимый остаток, чувствительный к действию магнитного поля. Масса остатка не должна превышать 1,5%
Посторонние примеси в остатке, чувствительном к действию магнитного поля	В рентгенофлуоресцентных спектрах остатка, нерастворимого в минеральных кислотах, должны отсутствовать линии посторонних примесей
Реакции подлинности	Согласно ГФ XI, в. 1, с. 160
Магнитная гетерогенность	Менее 3% частиц не управляется магнитным полем
Удельная поверхность	$S_{уд.}$ = 146–150 м^2/г
Диаметр агломератов	Микроскопически. Средний диаметр агломерата должен укладываться в интервал от 1,2 до 300 мкм
pH водной вытяжки	Потенциометрически. Значение pH водной вытяжки из 1%-й водной суспензии магнитного наполнителя должно лежать в интервале 7–8
Количественное определение	Титриметрически (дихроматометрически, перманганатометрически). Массовая доля железа в магнитном наполнителе должна укладываться в интервал от 38 до 60%

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны экспериментальные критерии, способы и методики контроля качества магнитных лечебных мазей, магнитных суппозиториев (в том числе магнитных ректальных суппозиториев с новокаином и ортофеном), железоуглеродного композита (компонента теплопроводящих сред для магнитокриовоз-

действий в криохирургии). Проведенные испытания показали перспективность использования разработанных критериев на практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю.Я. Харитонов, О.Г. Черкасова. Новые магнитные лечебные средства и лекарственные формы // Фармация. 1996. № 5. С. 14–19.
2. Е.Ю. Шабалкина. Нанодисперсные магнитные материалы и современные направления их использования в медицине и фармации // Фармация. 2008. № 5. С. 57–60.
3. О.Г. Черкасова, Е.Ю. Шабалкина, Ю.Я. Харитонов, С.Н. Цыбусов, В.И. Коченов. Использование мелкодисперсных железосодержащих композитов в лечении и диагностике: достижения и проблемы // Современные технологии в медицине. 2012. № 3. С. 113–120.
4. K.H. Bae, M. Park, M. Y. Do, N. Lee. Chitosan oligosaccharide-stabilized ferromagnetic iron oxide nanocubes for magnetically modulated cancer hyperthermia // ACS Nano. 2012. V. 6. № 6. P. 5266–5273.
5. C. Tassa, S.Y. Shaw, R. Weissleder. Dextran-coated iron oxide nanoparticles: A versatile plastform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics and therapy // Accounts of Chemical Research. V. 44. № 10. P. 842–852.
6. O.G. Cherkasova, Yu.Ya. Kharitonov. Magnetic ointments for the obturations of external gulletic and instinal fistulas // Transactions of the 2nd European Bioelectromagnetics Association Congress. Bled. Slovenia: Dec. 1993. P. 37–38.
7. A.V. Bykov, V.I. Nikolaev, E.R. Ruiz, Yu.Ya. Kharitonov, O.G. Cherkasova, V.I. Shulgin. Mössbauer research of magnetic particles in medicinal ointments // Hyperfine Interactions. 1991. 67. P. 603–606.
8. Е.Ю. Шабалкина, О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, В.А. Дорофеев. Химическая совместимость мелкодисперсных магнитных наполнителей с компонентами мазей // Фармация. 2012. № 4. С. 13–15.
9. O.G. Cherkasova, G.A. Grigorjeva, Yu. Ya. Kharitonov. Preparations and investigations of magnetic rectal suppositories // Transactions of the 2nd European Bioelectromagnetics Association Congress. Bled. Slovenia: Dec. 1993. P. 38.
10. A.V. Bykov, V.I. Nikolaev, C. Diaz, Yu.Ya. Kharitonov, O.G. Cherkasova, V.I. Shulgin. Mössbauer study of the magnetic filler for suppositories // Hyperfine Interactions. 1991. V. 67. P. 607–610.
11. О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, Н.Б. Саидов, О.В. Баринова, Т.С. Кондратьева, Л.Ф. Андреева. Разработка технологий традиционных и магнитных ректальных суппозиториев пармидина // Фармация. 1989. № 2. С. 13–16.
12. С.П. Завадский, О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов. Критерии контроля качества и свойства магнитных ректальных суппозиториев // Химико-фармацевтический журнал. 2000. Т. 14. № 10. С. 43–48.
13. Е.Ю. Шабалкина. Теплопроводность мазевых композиций для криохирургии // Фармация. 2009. № 4. С. 9–11.
14. Е.Ю. Шабалкина, О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, А.П. Арзамасцев, В.Н. Коченов, С.Н. Цыбусов. Контроль качества магнитных лекарственных средств для криологии // Нижний Новгород: Медицинская криология, 2006. 6. С. 179–181.
15. О.Г. Черкасова, С.П. Завадский, Е.Ю. Шабалкина, Ю.Я. Харитонов, И.И. Краснюк (мл.), А.В. Беляцкая, А.Н. Кузьменко. Определение содержания магнитных наполнителей в лекарственных формах // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2015. Т. 56. № 2. С. 106–112.
16. Г.К. Исмаилова. Изучение физико-химических свойств и стандартизация магнитоуправляемых липосом: дисс. … канд. фарм. наук. – Пятигорск, 2005. 142 с.
17. Ю. Я. Харитонов, О.Г. Черкасова, С.П. Завадский, С.Н. Цыбусов, И.И. Краснюк (мл.), В.Ю. Григорьева. Контроль качества магнитных наполнителей для магнитных лекарственных форм // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 3 (16). С. 100–106.
18. А.А. Гонием. Мелкодисперсный магнетит как магнитный компонент мазей на гидрофильно-липофильной основе: дисс. … канд. фарм. наук. – М., 1991. 167 с.
19. О.Г. Черкасова. Физико-химические основы применения мелкодисперсных магнитных материалов в фармации: дисс. … докт. фарм. наук. – М., 1993. 285 с.
20. ОФС.1.2.4.0002.15. Микробиологическая чистота // Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 1 – М. 2015.
21. ОФС.1.2.4.0002.15. Суппозитории // Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 2 – М., 2015.
22. М.Н. Денисова. Изучение связи между составом и свойствами магнитных ректальных суппозиториев с ферритом бария: дисс. … канд. фарм. наук. – М., 1997. 126 с.
23. М.В. Смолянинова. Изучение связи между составом и свойствами двуслойных магнитных ректальных суппозиториев с ферритом бария: дисс. … канд. фарм. наук. – М., 2000. 98 с.

УДК 615.2/.3.012, 543.42

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, Россия, г. Москва, Каширское ш., 24

1 – Federal State Budgetary Scientific Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», 24, Kashirskoye highway, Moscow, 115478, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: ilya.gulyakin@yandex.ru
Тел.: 8 (499) 324 14 54

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛХС-1208 В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

И.Д. Гулякин[1]*, Л.Л. Николаева[1], М.В. Дмитриева[1], Н.А. Оборотова[1], Е.В. Игнатьева[1], Н.А. Дмитричева[1], И.В. Ярцева[1], З.С. Шпрах[1]

Резюме. С целью обеспечения достоверных и точных результатов авторами проведена процедура валидации разработанной методики спектрофотометрического количественного определения действующего вещества для лиофилизированной липосомальной лекарственной формы отечественного гидрофобного противоопухолевого соединения из группы производных индолокарбазолов – ЛХС-1208. По результатам установления специфичности, линейности, диапазона применения, правильности и прецизионности валидированная методика может применяться в диапазоне 80–120% концентрации ЛХС-1208 в лекарственной форме.

Ключевые слова: ЛХС-1208, лиофилизированная лекарственная форма, спектрофотометрия, валидация.

VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION LHS-1208 IN THE LYOPHILIZED DOSAGE FORM

I.D. Gulyakin[1]*, L.L. Nikolaeva[1], M.V. Dmitrieva[1], N.A. Oborotova[1], E.V. Ignatieva[1], N.A. Dmitricheva[1], I.V. Yartseva[1], Z.S. Shprakh[1]

Abstract. In order to ensure reliable and accurate results, the authors carried out the validation procedure developed technique for spectrophotometric quantification of the active substance for the lyophilized liposomal formulation of national hydrophobic antitumor compounds from the group of indolocarbazole – LHS-1208. As a result of the establishment of the specificity, linearity, range of use, accuracy and precision of a validated method may be used in the range of 80–120% concentration LHS-1208 in the dosage form.

Keywords: LHS-1208, lyophilized dosage form, spectrophotometry, validation.

ВВЕДЕНИЕ

В ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана лиофилизированная лекарственная форма препарата из группы индолокарбазола «ЛХС-1208, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 9 мг» (патент РФ № 2572691), для стандартизации которой по количественному содержанию ЛХС-1208 предложена методика спектрофотометрического определения в ультрафиолетовой области спектра [1].

Установление соответствия качества лекарственных препаратов регламентируемым нормам предполагает применение различных аналитических методов, которые должны отвечать определенным требованиям. В процессе разработки новых методик можно своевременно выявить их недостатки с помощью валидации, что гарантирует достоверные и точные результаты анализа [2].

Цель данного исследования – валидация спектрофотометрической методики количественного определения ЛХС-1208 в лиофилизированной лекарственной форме (ЛИО-ЛФ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы

Субстанция ЛХС-1208 (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); Kollidon 17 PF (BASF, Германия), Cremophor ELP (BASF, Германия), вода очищенная (ФС 42-2619-97), диметилсульфоксид – ДМСО (ч.д.а., «Химмед», Россия), диметилформамид – ДМФА (ч.д.а., «Химмед», Россия).

Приборы и аппаратура

Весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), весы лабораторные Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия).

Весы аналитические Sartorius 2405

Методика количественного определения

Для приготовления испытуемого раствора содержимое одного флакона растворяли в небольшом количестве ДМФА, переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки ДМФА. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки тем же растворителем. В качестве стандартного образца (СО) использовали раствор субстанции ЛХС-1208 в ДМФА в соответствующей концентрации. Измерение оптической плотности испытуемого раствора проводили параллельно с измерением оптической плотности СО относительно ДМФА в максимуме при длине волны 320±2 нм.

Содержание ЛХС-1208 во флаконе (X, мг) рассчитывали по формуле:

$$X = D_1 \times a_0 \times P / D_0 \times 100,$$

где D и D_0 – соответственно оптические плотности растворов образца лекарственной формы (ЛФ) и СО ЛХС-1208; a_0 – навеска СО ЛХС-1208 в мг; P – содержание ЛХС-1208 в СО в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение спектральных характеристик ЛХС-1208 и его идентификация (определение подлинности) в ЛИО-ЛФ

Разработку методики количественного определения действующего вещества в ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 начали с изучения электронного спектра поглощения. Данная субстанция практически нерастворима в воде, измерения проводили для растворов ЛХС-1208 в ДМФА, которые имеют характерные электронные спектры поглощения (ЭСП): в области 200-500 нм наблюдаются максимум поглощения при 287±2 нм, плечо при 306±2 нм; максимум поглощения при 320±2 нм, плечо при 343±2 нм, слабо интенсивный максимум при 420 нм (рисунок 1). Отношение значений оптической плотности в максимумах D320/D287 составляет 1,42±0,05.

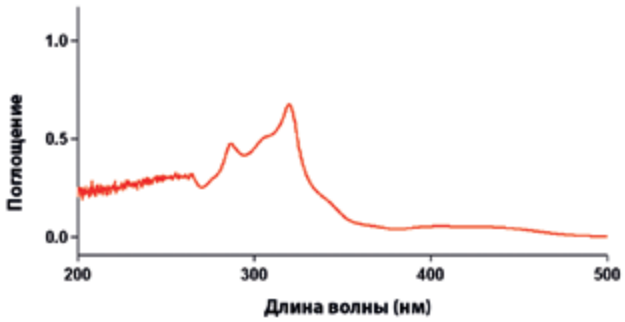


Рисунок 1. Электронный спектр поглощения субстанции ЛХС-1208

В максимуме при λ_{max}=320 нм наблюдается более интенсивное поглощение, поэтому он был выбран в качестве аналитического сигнала. Для снижения систематических и случайных ошибок при определении ЛХС-1208 в ЛФ в методику спектрофотометрического анализа ввели способ расчета по СО. В качестве СО использовали субстанцию ЛХС-1208.

Рабочей концентрацией раствора ЛХС-1208 выбрали концентрацию 0,006-0,008 мг/мл; при этом величина оптической плотности укладывается в интервал, рекомендуемый ГФ XIII, а максимумы поглощения в растворах субстанции и ЛФ совпадают (рисунок 2).

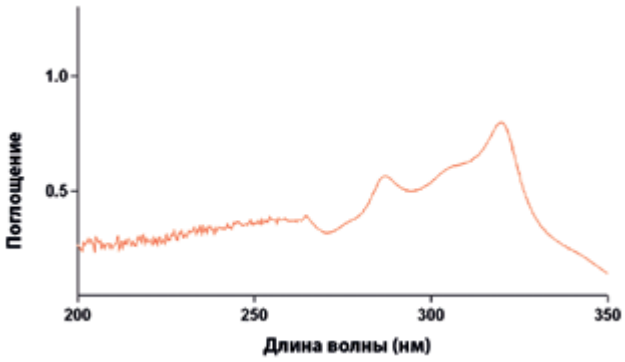


Рисунок 2. Электронный спектр поглощения раствора ЛИО-ЛФ ЛХС-1208

Специфичность

Специфичность – это способность аналитической методики давать правильный результат определения вещества в присутствии сопутствующих компонентов.

При разработке спектрофотометрической методики количественного определения необходимо учитывать влияние вспомогательных веществ, входящих в состав ЛФ, на спектральные характеристики действующего вещества. В нашем случае на разных этапах разработки ЛФ в состав моделей включались такие вспомогательные вещества, как ДМСО, Cremophor ELP, Kollidon 17PF в разных количествах.

На рисунках 3 и 4 представлены ЭСП растворов Cremophor ELP с ДМСО и Kollidon 17PF в ДМФА. Из рисунков видно, что эти растворы в области 270-350 нм не имеют собственного поглощения, и следовательно, присутствие Cremophor ELP, ДМСО и Kollidon 17PF не мешает определению основного действующего вещества. В качестве раствора сравнения поэтому возможно использование ДМФА без добавления вспомогательных веществ.

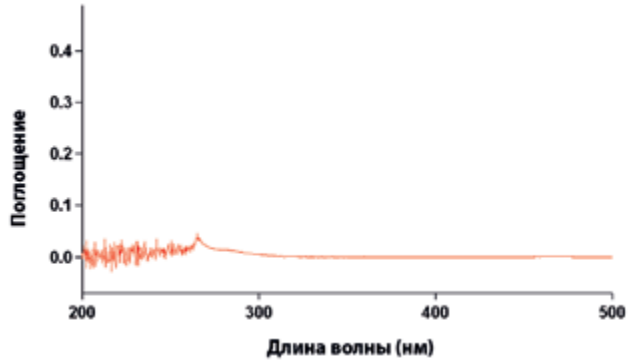


Рисунок 3. Электронный спектр поглощения раствора Cremophor ELP с ДМСО в ДМФА

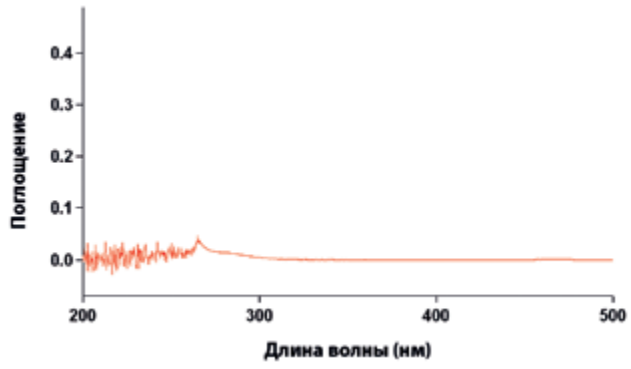


Рисунок 4. Электронный спектр поглощения раствора Kollidon 17PF в ДМФА

В качестве аналитической выбирали длину волны, при которой пик ЛХС-1208 имеет наибольшее разрешение и интенсивность. Для анализа ЛХС-1208 в разработанной ЛФ наиболее удобно использовать длину волны с максимумом около 320±2 нм, поскольку данный пик является разрешенным, узким и позволяет измерять оптическую плотность концентрированных растворов ЛХС-1208.

Исходя из вышеизложенного, ЭСП ЛХС-1208 может использоваться для идентификации и количественного определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ, а применяемая методика спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 является специфичной.

Диапазон применения

Методика количественного определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ должна быть применима в интервале от 80 до 120% от номинального значения определяемой концентрации действующего вещества в ЛФ. В пределах заданного диапазона получаемые с использованием валидируемой методики результаты должны иметь приемлемый уровень линейности, правильности и прецизионности.

Линейность

Линейность аналитической методики считается доказанной, если в выбранном диапазоне применения можно показать прямо пропорциональное соотношение между концентрацией исследуемого вещества в растворе и сигналом детектора (фактором отклика).

При валидации разработанной методики спектрофотометрического анализа ее линейность проверяли экспериментально измерением аналитических сигналов для 5 проб с различными концентрациями ЛХС-1208 в диапазоне от 80 до 120%. Причем значение оптической плотности для каждой пробы получали путем расчета среднего значения из нескольких измерений.

Для эксперимента готовили модельные смеси ЛИО-ЛФ, представляющие собой растворы вспомогательного вещества Kollidon 17 PF и действующего вещества ЛХС-1208 в ДМСО с концентрациями действующего вещества от 1,35 до 1,84 мг/мл. Значение коэффициента корреляции составило более 0,999, что свидетельствует о наличии достаточно тесной линейной связи между концентрацией ЛХС-1208 и оптической плотностью в диапазоне концентраций от 80 до 120% (таблица 1).

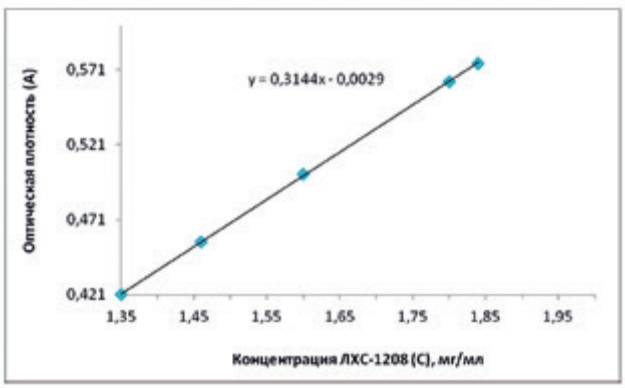


Рисунок 5. Графическое изображение регрессионной прямой линейности методики количественного анализа ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ при 320 нм

Таблица 1.

Оценка линейности методики спектрофотометрического количественного анализа ЛХС-1208

Концентрация ЛХС-1208		Среднее значение оптической плотности, А	Регрессия
%	мг/мл		
80	1,350	0,421	0,422
90	1,460	0,456	0,456
100	1,600	0,502	0,500
110	1,800	0,563	0,563
120	1,840	0,575	0,576
Статистические характеристики			**Результаты**
Наклон прямой (b)			0,314
Отрезок на оси ординат (a)			–0,003
Доверительный интервал (95%) b			0,314±0,235
Коэффициент корреляции (R)			0,99993

Уравнение регрессии для данной линейной зависимости имеет вид y=0,314x–0,003. Графическое представление линейности методики показано на рисунке 5.

Правильность (точность)

Правильность аналитического метода характеризует близость результатов испытаний, полученных данным методом, к истинному значению. Правильность валидируемой методики устанавливали по результатам ее применения к анализу модельной смеси, включающей все компоненты ЛФ и известное количество определяемого вещества в пределах диапазона применения. С этой целью готовили по три модельные смеси для каждой из трех концентраций: 80, 100 и 120%. Оценку правильности методики на основе 9 результатов проводили путем расчета процента восстановления (отклик), стандартного отклонения, коэффициента вариации, доверительного интервала среднего значения (P=95%) и относительной погрешности среднего результата (таблица 2).

На основании полученных результатов, представленных в таблице 2, разработанную методику спектрофотометрического анализа можно считать правильной, так как отклонения от среднего значения (100,03±0,13) укладываются в интервал концентраций ЛХС-1208 (8,1-9,9 мг/флакон), заявленных в проекте НД на ЛИО-ЛФ ЛХС-1208, и относительная погрешность среднего результата не превышает 1%.

Прецизионность

Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно значения среднего результата. Прецизионность методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 определяли по оценке повторяемости результатов и внутрилабораторной прецизионности.

А. Повторяемость (сходимость)

Повторяемость аналитической методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых условиях в одной лаборатории одним и тем же исполнителем в пределах короткого промежутка времени. Испытание проводили на 6 образцах ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 одной серии. Критерий приемлемости выражался величиной коэффициента вариации. На основании полученных данных (таблица 3) коэффициент вариации составил менее 1% (0,075%), что свидетельствует о незначительной изменчивости вариационного ряда и прецизионности методики в условиях повторяемости.

Таблица 2.

Оценка правильности методики спектрофотометрического количественного анализа ЛХС-1208

Концентрация, %	№ пробы	ЛХС-1208, мг		Отклик, %
		Содержание ЛХС-1208 в модельной смеси, мг	Найденное значение, мг	
80	1	8,10	8,12	100,25
	2	8,09	8,10	100,12
	3	8,11	8,09	99,75
100	4	9,60	9,61	100,10
	5	9,62	9,63	100,10
	6	9,60	9.62	100,21
120	7	11,04	11,02	99,82
	8	11,05	11.04	99,91
	9	11,05	11,05	100,00
Статистические характеристики, %				**Результаты**
Среднее значение				100,03
Стандартное отклонение				0,172
Коэффициент вариации				0,17
Доверительный интервал				100,03±0,13
Относительная погрешность				0,13

Б. Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность

Для определения промежуточной прецизионности измеряли содержание действующего вещества в 6

пробах, полученных в условиях работы одной лаборатории разными аналитиками в разные дни.

При анализе результатов определения концентрации ЛХС-1208 (мг/флакон) в различных условиях (таблица 4) обнаружено, что при сравнении расчетного и табличного значения критерия Стьюдента выполнялось неравенство $t_{рас}=0,5<t_{таб}=2,23$; что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки измерений. На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что расхождения результатов анализа, полученных двумя исследователями, случайны. Таким образом, установлена промежуточная прецизионность спектрофотометрической методики количественного определения ЛХС-1208 в разработанной ЛИО-ЛФ.

Таблица 3.

Оценка повторяемости методики спектрофотометрического количественного анализа ЛХС-1208

№ образца	Содержание ЛХС-1208 во флаконе, мг
1	9,286
2	9,305
3	9,305
4	9,298
5	9,300
6	9,298
Статистические характеристики	**Результаты**
Среднее значение, мг/фл	9,298
Дисперсия	0,000049
Стандартное отклонение, мг/фл	0,007
Коэффициент вариации, %	0,075
Доверительный интервал, мг/фл	9,298±0,007
Относительная погрешность, %	0,075

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований получена лиофилизированная лекарственная форма ЛХС-1208 и разработаны методики качественного ТСХ-анализа и количественного спектрофотометрического определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ ее получения.

Электронный спектр поглощения ЛХС-1208 может использоваться для идентификации и количественного определения ЛХС-1208 в лиофилизированной лекарственной форме (ЛИО-ЛФ), а применяемая методика спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 является специфичной.

Разработанная методика и ее аналитический диапазон в интервале от 80 до 120% от номинального значения определяемой концентрации действующего вещества в ЛИО-ЛФ пригодны для решения поставленных аналитических задач. Методику спектрофотометрического анализа можно считать правильной, так как отклонения от среднего значения укладываются в интервал концентраций ЛХС-1208, заявленных в проекте НД на ЛИО-ЛФ ЛХС-1208, и относительная погрешность среднего результата не превышает 1%. Коэффициент вариации составил менее 1%, что свидетельствует о незначительной изменчивости вариационного ряда и прецизионности методики в условиях повторяемости. Установлена промежуточная прецизионность спектрофотометрической методики количественного определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ.

Таблица 4.

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики спектрофотометрического количественного анализа ЛХС-1208

№ пробы	Содержание ЛХС-1208 во флаконе, мг	
	Аналитик 1	Аналитик 2
1	9,286	9,301
2	9,305	9,292
3	9,305	9,297
4	9,298	9,303
5	9,300	9,301
6	9,298	9,306
Статистические характеристики	**Результаты**	
Среднее значение, мг/фл	9,298	9,300
Дисперсия S^2, мг/фл	$4,7\times10^{-5}$	$4,9\times10^{-5}$
Стандартное отклонение, мг/фл	0,0069	0,0070
Коэффициент вариации, %	0,074	0,075
Доверительный интервал, мг/фл	9,298±0,0072	9,300±0,0070
Относительная погрешность, %	0,077	0,075
$t_{таб}(95\%;10)=2,23$	$t_{рас}=0,5$	

ЛИТЕРАТУРА

1. ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях // Государственная фармакопея, XIII изд.
2. ОФС 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея, XIII изд.

23-я Международная специализированная выставка

аптека 2016

ufi Approved Event

РОССИЙСКАЯ НЕДЕЛЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

DECEMBER
5–8
ДЕКАБРЯ

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ДЕЛОВОЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ

INTERNATIONAL MEDICAL AND PHARMACEUTICAL BUSINESS FORUM

Международный Форум

Традиционные медицинские системы мира

International Forum TRADITIONAL MEDICAL SYSTEMS OF THE WORLD

Москва
ЦВК «Экспоцентр»
павильон № 7

Pav.7, Expocentre
Fairgrounds, Moscow

Ждем вас на нашей выставке!

Организатор:
ЕВРОЭКСПО
EUROEXPO

16+

www.aptekaexpo.ru

УДК 612.07

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В ИННОВАЦИОННОЙ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ МЕТОДОМ ГЖХ ПИД

Е.В. Бутина[1], С.А. Зайцев[1]*, А.В. Басевич[2]

1 – ЗАО «БИОКАД», Россия, 198515, г. Санкт-Петербург, Петродворцовый район, п. Стрельна, ул. Связи, 34, лит. А

2 – ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

1 – CJSC «BIOCAD», lit. A, 34, Svyazi str., Strelna, Petrodvortsoviy district, Saint-Petersburg, 198515, Russia

2 – State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Saint-Petersburg state chemical-pharmaceutical Academy» of the Ministry of health of the Russian Federation, lit. A, 14, Professor Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: Zajtsev@biocad.ru

Резюме. Целью исследования являлась разработка и валидация новой методики количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции А с применением ГЖХ. Исследования проведены на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором и отбором проб из паровой фазы. Исследовано влияние полярности стационарной фазы на хроматографическое разделение пиков органических растворителей: хлороформа, этанола, метиленхлорида, циклогексана, этилацетата, метанола, N,N-диметилформамида, 2-пропанола. Хроматографическое разделение этанола, метанола, 2-пропанола, этилацетата, метиленхлорида и циклогексана осуществлено на кварцевой капиллярной колонке DB-624, 30 м × 0,320 мм, 1,8 мкм; хлороформа и N,N-диметилформамида – на колонке DB-WAX, 30 м × 0,250 мм, 0,25 мкм. Определены показатели пригодности хроматографической системы и критерии валидности методики. Методика обладает высокой специфичностью, точностью, линейностью, надежностью и чувствительностью.

Ключевые слова: остаточные органические растворители, валидация, разработка методики, активная фармацевтическая субстанция.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF RESIDUAL ORGANIC SOLVENTS IN INNOVATIVE ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT WITH GC-FID

E.V. Butina[1], S.A. Zaitsev[1]*, A.V. Basevich[2]

Abstract. The aim of the study was to develop and validate a new method of quantitative determination of residual organic solvents in a substance A using GLC. Studies were carried out with gas chromatography with a flame ionization detector and sampling from the vapor phase. The effect of the polarity of the stationary phase for the chromatographic separation of the organic solvents peaks: Chloroform, Ethanol, Methylene Chloride, Cyclohexane, Ethyl Acetate, Methanol, N, N- dimethylformamide, 2-propanol was investigated. Chromatographic separation of Ethanol, Methanol, 2-propanol, Ethyl Acetate, Methylene Chloride and Cyclohexane was performed with quartz capillary column DB-624, 30 m × 0.20 mm, 1.8 micron; Chloroform and N, N-dimethylformamide – DB-WAX, 30 m × 0.50 mm, 0.25 mm. System suitability criteria and the validity of method were determined. Method has high specificity, precision, linearity, sensitivity and reliability.

Keywords: residual organic solvents, validation, development of method, active pharmaceutical ingredient.

ВВЕДЕНИЕ

Для минимизации рисков фармацевтические компании включают двух и более производителей активной фармацевтической субстанции (АФС) одного наименования в регистрационные документы на готовый лекарственный препарат.

В соответствии с политикой компании ЗАО «Биокад» информация по МНН и названию производителей АФС является конфиденциальной, поэтому в настоящей работе приняты следующие условные обозначения объектов исследования: А – МНН субстанции.

Активная фармацевтическая субстанция А представляет собой химико-фармацевтическую субстанцию и предполагается к закупке у нескольких производителей для производства лекарственного препарата в ЗАО «Биокад».

В соответствии с федеральным законом № 61-ФЗ при производстве лекарственного препарата должна быть использована АФС, внесенная в государственный реестр лекарственных средств (ГРЛС) [1]. В рамках подачи заявки на внесение производителя АФС в ГРЛС должно быть предоставлено подтверждение, что методика контроля качества АФС прошла этап валидации и обладает необходимой селективностью, правильностью, надежностью, сходимостью, воспроизводимостью и высокой чувствительностью.

В ЗАО «Биокад» на этапе выбора, согласования и квалификации производителя субстанции А у поставщика АФС были запрошены методики для характеризации полученного образца субстанции А.

При апробации методики количественного определения остаточных органических растворителей, предложенной производителем, было установлено, что параметры анализа не позволяют добиться хроматографического разделения метиленхлорида, 2-пропанола и этанола, нормируемых в АФС.

Таким образом, главной целью настоящей работы была разработка новой селективной методики количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции А с применением метода ГЖХ-ПИД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на образце субстанции А, предоставленной поставщиком для оценки качества и принятия решения о включении производителя в ГРЛС.

Исходя из схемы синтеза АФС, производителем были заявлены следующие остаточные органические растворители для контроля в субстанции А: хлороформ, этанол, метиленхлорид, циклогексан, этилацетат, метанол, N,N-диметилформамид, 2-пропанол.

В качестве стандартных образцов (СО) были использованы реактивы с качеством для ГЖХ (чистотой не менее 99,9%) фирмы Panreac, Испания.

Разработка и валидация методик количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции А проводилась на газовом хроматографе с пламенно-ионизационном детектором (Agilent 6890N, Agilent Technologies, США) и автодозатором паровой фазы (Agilent G1888, Agilent Technologies, Италия). Обработку сигнала и полученных результатов осуществляли при помощи программы Chem Station Rev. B.04.03(16), Agilent Technologies, США.

Газовый хроматограф Agilent 6890N

Автодозатор паровой фазы Agilent G1888

Хроматографический анализ проведен на следующих колонках:

1. Кварцевая капиллярная колонка DB-624, 30 м × 0,320 мм, 1,8 мкм, Agilent Technologies, США (колонка 1);
2. Кварцевая капиллярная колонка DB-WAX, 30 м × 0,250 мм, 0,25 мкм, Agilent Technologies, США (колонка 2).
3. Кварцевая капиллярная колонка DB-1, 30 м × 0,250 мм, 0,25 мкм, Agilent Technologies, США (колонка 3).

В качестве растворителя для подготовки проб был выбран N,N-диметилацетамид для ГЖХ (Panreac, Испания).

Статистическая обработка результатов проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате апробации методики производителя на колонке 2 были получены хроматограммы стандартного раствора – смеси растворителей хлороформа (0,03 мг/мл), этанола (2,5 мг/мл), метиленхлорида (0,3 мг/мл), циклогексана (1,94 мг/мл), этилацетата (2,5 мг/мл), метанола (1,5 мг/мл), N,N-диметилформамида (0,44 мг/мл), 2-пропанола (2,5 мг/мл) в N,N-диметилацетамиде.

На рисунке 1 представлена типичная хроматограмма стандартного раствора методики производителя.

В таблице 1 представлены времена удерживания, критерии разделения и пригодности хроматографической системы.

На основании анализа полученных данных был сделан вывод, что методика производителя не позволяет добиться хроматографического разделения метиленхлорида, 2-пропанола и этанола, поскольку пики нормируемых растворителей перекрывают друг друга и не поддаются количественному определению.

Таблица 1.

Значения времен удерживания и критериев пригодности хроматографической системы, полученные по методике производителя

Соединение	Время удерживания, мин	Фактор асимметрии пиков	Разрешение соседних пиков	Число теоретических тарелок
Циклогексан	1,829±0,037	0,90±0,02	–	51323±25
Этилацетат	2,879±0,053	0,88±0,04	26,36±0,11	59493±35
Метанол	3,037±0,027	0,92±0,02	3,49±0,21	78235±22
Метиленхлорид	3,480±0,025	0,65±0,05	10,11±0,17	99986±37
2-пропанол	3,534±0,033	0,86±0,03	1,03±0,12	52065±36
Этанол	3,640±0,024	0,82±0,05	1,81±0,15	71941±29
Хлороформ	4,997±0,043	1,01±0,03	28,15±0,20	226327±23
N,N-диметилформамид	7,687±0,055	1,16±0,04	80,22±0,18	1521441±127

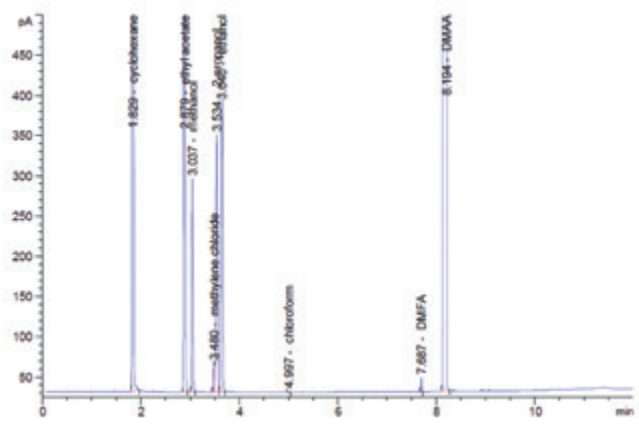


Рисунок 1. Типичная хроматограмма стандартного раствора методики производителя

В исследованиях были использованы колонки 1, 2, 3. Изменение скорости газа-носителя, температурных режимов испарителя и термостатана на колонке 2 не привело к улучшению разрешения пиков метиленхлорида и 2-пропанола.

На колонке 3 наблюдалось неудовлетворительное разрешение пиков хлороформа и этилацетата в разных условиях хроматографического анализа.

Удовлетворительного разделения пиков метиленхлорида, 2-пропанола и этанола удалось добиться на колонке 1 без ухудшения разделения пиков метанола, этилацетата и циклогексана.

На колонке 1 не удалось определить хлороформ и N,N-диметилформамид. Для нормирования этих соединений была оставлена методика производителя на колонке 2 с оптимизацией имеющихся условий анализа, что не является объектом данного исследования.

Для оптимизации условий разделения метиленхлорида, 2-пропанола, этанола, метанола, этилацетата и циклогексана было изучено влияние скорости газаносителя, температурных режимов испарителя и термостата на разделение исследуемых соединений.

В результате проведенных исследований были выбраны следующие условия проведения анали-

Таблица 2.

Значения времен удерживания и критериев пригодности хроматографической системы, полученные по разработанной методике

Соединение	Время удерживания, мин	Относительное стандартное отклонение, %	Фактор асимметрии пиков	Разрешение соседних пиков	Число теоретических тарелок
Метанол	4,427±0,013	4,42	1,22±0,01	–	49042±39
Этанол	5,795±0,025	4,33	1,11±0,04	17,46±0,51	92004±29
2-пропанол	6,658±0,013	4,39	1,03±0,03	11,65±0,31	138818±56
Метиленхлорид	7,106±0,010	3,29	0,98±0,02	6,75±0,21	218106 ± 44
Этилацетат	8,640±0,011	3,10	1,01±0,02	26,68±0,71	412646±51
Циклогексан	9,159±0,014	3,13	1,03±0,01	9,14±0,21	379522±135

за: кварцевая капиллярная колонка DB-624, 30 м × 0,320 мм, 1,8 мкм, температура испарителя – 230 °С, газ-носитель – азот, линейная скорость – 19 см/с, температура термостата начальная – 40 °С, время выдержки при начальной температуре термостата – 5 мин, скорость изменения температуры термостата – 20 °С/мин, температура термостата конечная – 220 °С, время выдержки при конечной температуре термостата – 6 мин, температура детектора – 240 °С, скорость водорода – 40 мл/мин, скорость водуха – 400 мл/мин, скорость газа-поддува (азот) – 25 мл/мин, коэффициент деления потока – 1:10, температура термостата автодозатора паровой фазы – 85 °С, время термостатирования образцов – 30 мин, объем петли дозатора – 1 мл.

На рисунке 2 представлена типичная хроматограмма исследуемого раствора метиленхлорида (0,06 мг/мл), 2-пропанола (0,5 мг/мл), этанола (0,5 мг/мл), метанола (0,3 мг/мл), этилацетата (0,5 мг/мл) и циклогексана (0,388 мг/мл) в N,N-диметилацетамиде. Концентрации в растворе были выбраны с учетом ожидаемого содержания остаточных органических растворителей в субстанции А и требований ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» [3].

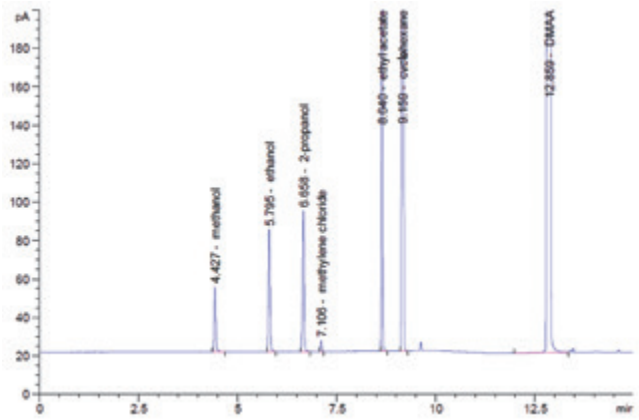


Рисунок 2. Типичная хроматограмма исследуемого раствора

В таблице 2 представлены времена удерживания, относительные стандартные отклонения площадей пиков, критерии разделения и пригодности хроматографической системы.

В установленных при исследовании условиях наблюдалось полное разделение метиленхлорида, 2-пропанола, этанола, метанола, этилацетата и циклогексана.

На основании представленных в таблице 2 данных выбраны следующие критерии пригодности хроматографической системы: разрешение между двумя соседними пиками нормируемых растворителей – не менее 1,5; относительное стандартное отклонение площадей пиков каждого нормируемого растворителя – не более 5,0%; факторы асимметрии для пиков каждого нормируемого растворителя – не более 1,5; эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам нормируемых растворителей, – не менее 10000 теоретических тарелок.

В рамках проведенных исследований было установлено, что присутствие субстанции А в растворе в концентрации 10–150 мг/мл не влияло на хроматографическое разделение исследуемых соединений. Была выбрана рабочая концентрация раствора субстанции А в N,N-диметилацетамиде – 100 мг/мл.

В результате проведенных исследований разработана следующая методика.

100,0 мг (точная навеска) субстанции А помещают во флакон вместимостью 10 мл, прибавляют 1,0 мл N,N-диметилацетамида, закрывают прокладкой из политетрафторэтилена и обжимают алюминиевым колпачком, перемешивают до полного растворения навески и термостатируют при 85 °С в течение 30 мин (испытуемый раствор).

150,0 мг (точная навеска) метанола, 250,0 мг (точная навеска) этанола, 250,0 мг (точная навеска) 2-пропанола, 30,0 мг (точная навеска) метиленхлорида, 250,0 мг (точная навеска) этилацетата, 194,0 мг (точная навеска) циклогексана помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую около 30 мл N,N-диметилацетамида, перемешивают, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают во флакон вместимостью 10 мл, закрывают прокладкой из политетра-фторэтилена и обжимают алюминиевым колпачком, термостатируют при 85 °С в течение 30 мин (стандартный раствор).

Последовательно хроматографируют по 1 мл стандартного раствора, регистрируют 6 хроматограмм, затем – по 1 мл испытуемого раствора, регистрируют 3 хроматограммы.

Идентификацию примесей и пригодность хроматографической системы оценивают по стандартному раствору.

Последовательность выхода пиков растворителей на хроматограммах стандартного раствора: метанол, этанол, 2-пропанол, метиленхлорид, этилацетат, циклогексан.

Содержание каждого остаточного органического растворителя в субстанции (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 500},$$

где S – площадь пика органического растворителя на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика органического растворителя на хроматограмме стандартного раствора; a – навеска субстанции, мг; a_0 – навеска СО органического растворителя, мг; P – содержание основного вещества органического растворителя в СО, %.

Валидация методики проведена по следующим критериям: специфичность, предел количественного определения (ПКО), линейность, правильность, точность (сходимость), диапазон применения [4].

Специфичность методики была доказана на исследуемых растворах в присутствии основного вещества субстанции А. Результаты испытаний подтвердили способность разработанной методики разделять пики нормируемых остаточных органических растворителей (см. рисунок 2, таблицу 2).

Пределы количественного определения для нормируемых остаточных органических растворителей составили следующие значения: 0,0034 мг/мл для метанола, 0,0023 мг/мл для этанола, 0,00097 мг/мл 2-пропанола, 0,0028 мг/мл для метиленхлорида, 0,00059 мг/мл для этилацетата, 0,0001 мг/мл для циклогексана.

Результаты исследования критерия «линейность» показали, что между концентрациями остаточных органических растворителей и площадями их пиков существует линейная зависимость в концентрациях от ПКО до 0,45 мг/мл для метанола, 0,75 мг/мл для этанола, 0,75 мг/мл для 2-пропанола, 0,09 мг/мл для метиленхлорида, 0,75 мг/мл для этилацетата, 0,582 мг/мл для циклогексана.

Правильность разработанной методики определяли путем сопоставления результатов эксперимента и истинных значений. Исследуемые растворы для критерия «правильность» готовили путем растворения точной навески субстанции А в растворе ПКО, стандартном растворе и растворе с содержанием растворителей в концентрациях 150% от их концентраций в стандартном растворе. Относительная ошибка количественного определения остаточных органических растворителей не превышала 4%.

Сходимость результатов была показана на серии независимо приготовленных исследуемых растворов. Относительное стандартное отклонение площадей пиков нормируемых остаточных органических растворителей не превышало 5 % (см. таблицу 2).

Критерии «линейность», «правильность» и «точность» соответствуют предписанным требованиям в диапазоне концентраций для этанола – от 0,0034 мг/мл до 0,45 мг/мл, этанола – от 0,0023 мг/мл до 0,75 мг/мл, для 2-пропанола – от 0,00097 мг/мл до 0,75 мг/мл, для метиленхлорида – от 0,0028 мг/мл до 0,09 мг/мл, для этилацетата – от 0,00059 мг/мл до 0,75 мг/мл, для циклогексана – 0,00010 мг/мл до 0,582 мг/мл. Указанные диапазоны являются диапазонами применения разработанной методики.

Разработанная методика была использована для анализа остаточных органических растворителей в образцах трех серий субстанции А. Во всех исследуемых образцах был обнаружен 2-пропанол в содержании до 0,5%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработана методика количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции А с помощью газожидкостной хроматографии. Разработанная методика валидирована в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [4]. Определены показатели пригодности системы и критерии надежности методики. Разработанная методика была использована для анализа образцов трех серий субстанции А. В исследуемых образцах был обнаружен 2-пропанол с содержанием его на уровне до 0,5%. Других остаточных органических растворителей обнаружено не было.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 12.04.2010 №61-ФЗ (ред. от 29.12.2015) «Об обращении лекарственных средств». URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/702a172c82a752194880a43d24a9c3c323343da5/ (дата обращения 20.05.2016).
2. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#235/z (дата обращения 20.05.2016).
3. ОФС.1.1.0008.15. Остаточные органические растворители // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#187/z (дата обращения 20.05.2016).
4. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Том I. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#222/z (дата обращения 20.05.2016).

Agilent Technologies

Новое поколение систем ГХ

Agilent 9000 Intuvo

Intuvo - полностью интегрированное решение, которое включает оборудование, расходные материалы, программное обеспечение и услуги, предоставляет уникальные технологические возможности.

- Исключен трудоемкий процесс обрезания колонок
- Герметичное соединение происходит менее чем за 2 мин
- Максимальная производительность детектирования
- Гибкая система ввода проб
- Мгновенный доступ к информации об оборудовании
- Промежуточная оптимизация между циклами всего за несколько минут
- Сокращение расходов на энергосбережение и системы ОВКВ, экономия пространства в лаборатории

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com

УДК 546.32

1 – Институт биохимической технологии и нанотехнологии ФГАО ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 10/2

1 – Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology Peoples' Friendship University of Russia, 10/2, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: stoinova17@mail.ru
Тел.: 8 (499) 936 86 25

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ

А.М. Стойнова[1]*, А.В. Пономарева[1], Я.М. Станишевский[1]

Резюме. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) исследовано 5 образцов лекарственных форм от различных производителей, содержащих ацетилсалициловую кислоту. Установлено, что количество ацетилсалициловой кислоты в этих препаратах равно 80–85 мас.%, что отвечает нормативной базе ГФ XIII [1].

Ключевые слова: дифференциальная сканирующая калориметрия, ДСК, ацетилсалициловая кислота.

ASSAY OF ACETYLSALICYLIC ACID IN DRUG PRODUCTS BY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

A.M. Stoinova[1]*, A.V. Ponomareova[1], Ya.M. Stanishevskiy[1]

Abstract. Five dosage forms from various manufacturers containing acetyl salicylic acid was investigated with the DSC method. It was found that the amount of acetylsalicylic acid in these preparations is equal to 80-85 wt.%, which corresponds to the regulatory framework of the SP XIII [1].

Keywords: differential scanning calorimetry, DSC, acetylsalicylic acid.

ВВЕДЕНИЕ

Расширение ассортимента лекарственных препаратов и повышение требований к их качеству диктует необходимость использования альтернативных методов определения количества действующего вещества в лекарственных препаратах. Одним из таких методов может быть метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [2].

В данной работе метод ДСК применялся для определения количества ацетилсалициловой кислоты в лекарственных препаратах. Ацетилсалициловая кислота – активное вещество, оказывающее противовоспалительный, жаропонижающий и болеутоляющий эффекты, которое широко применяется при лихорадочных состояниях, головной боли, ревматизме, а также является тромбоцитарным антиагрегантом, использующимся в профилактике и лечении ишемического инсульта [3].

На территории РФ зарегистрировано 26 отечественных и 8 зарубежных производителей лекарственных препаратов, содержащих в качестве действующего вещества ацетилсалициловую кислоту, но фактически в настоящее время на рынке имеют обращение препараты 5 производителей [4].

В связи с этим целью данной работы является нахождение метрологических характеристик определения ацетилсалициловой кислоты в лекарственных препаратах методом ДСК.

Для выполнения цели работы были поставлены следующие задачи.

1. Провести измерение зависимостей сигнала ДСК (мкВ) от температуры (°С).
2. Определить содержание ацетилсалициловой кислоты в препарате.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе исследовали образцы препаратов, содержащих ацетилсалицилову кислоту в форме таблеток, по 500 мг активного вещества на одну таблетку, разных фирм-производителей.

1) Образец 1: ЗАО «Русфар», Россия, г. Хабаровск.
2) Образец 2: ЗАО «Медисорб», Россия, г. Пермь.

3) Образец 3: ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия, г. Курск.

4) Образец 4: ОАО «Татхимфармпрепараты», Россия, г. Казань.

5) Образец 5: ЗАО «Производственная фармацевтическая компания Обновление», Россия, г. Новосибирск.

Для количественного определения ацетилсалициловой кислоты в лекарственных препаратах использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии [2].

В начале эксперимента таблетки ацетилсалициловой кислоты размельчили в ступке до однородного порошка. Далее каждый образец помещали в тигель и устанавливали в измерительную ячейку.

В работе использовался алюминиевый тигель. Нагрев проводился в диапазоне температур от 80 °С до 180 °С со скоростью нагрева 10, 20, 30 К/мин. Охлаждение измерительной ячейки производилось воздухом с помощью внешнего компрессора. В качестве защитного газа использовался аргон.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения оптимального режима измерений на примере образца 1 были подобраны следующие условия: интервал температур от 80 до 180 °С, скорость развёртки варьировались от 10 до 30 К/мин, в качестве очищающего и защитного газа использован высокочистый аргон (99,5%). Измерения проводились при скорости развертки температуры 10, 20, 30 К/мин (рисунок 1).

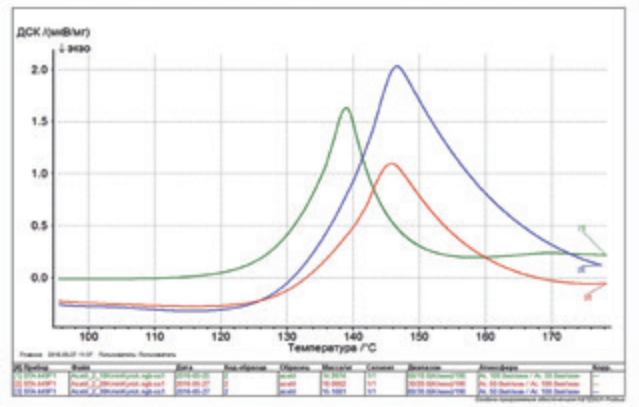


Рисунок 1. Разложение ацетилсалициловой кислоты при скорости нагрева 10, 20, 30 К/мин

Как видно из рисунка 1, оптимальным является измерение при 10 К/мин, а при скоростях развертки 20 и 30 К/мин пик получается размытым и площадь пика определить невозможно. Измерение при скорости развертки меньше 10 К/мин является более точным, так как чем меньше «температурный шаг», тем более четким получается пик ДСК, но требуется больше времени для проведения каждого эксперимента.

В ходе проведения эксперимента было обнаружено, что исследуемое вещество (ацетилсалициловая кислота) имеет температуру разложения и нагревания почти одинаковую (Т плавления составляет 136 °С, Т разложения – 150 °С).

На рисунках 2–6 представлены диаграммы разложения ацетилсалициловой кислоты при скорости нагрева 10 К/мин всех исследуемых образцов.

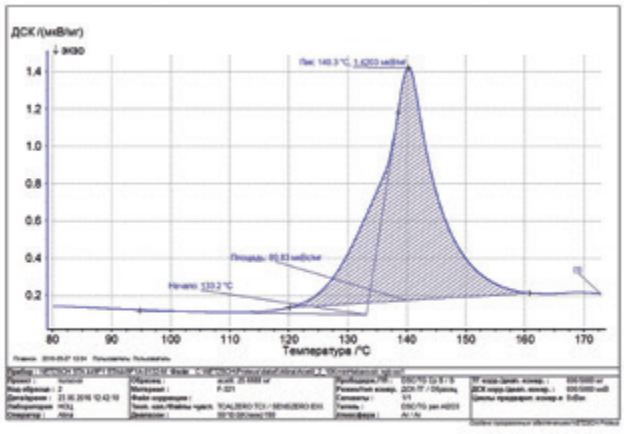


Рисунок 2. Образец 1

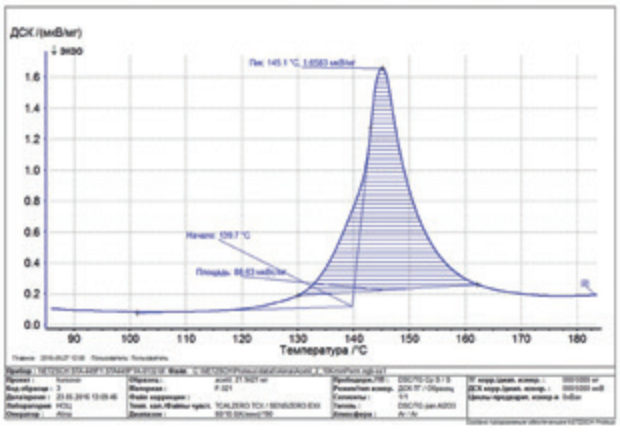


Рисунок 3. Образец 2

На рисунке 7 представлены данные ДСК-анализа (зависимости теплоемкости от температуры) для всех исследуемых образцов. Как видно из обобщенного графика ДСК-кривых для всех исследуемых образцов, зависимость теплоемкости от температуры каждого из них неодинакова, что дает возможность делать предварительные выводы о разном количественном

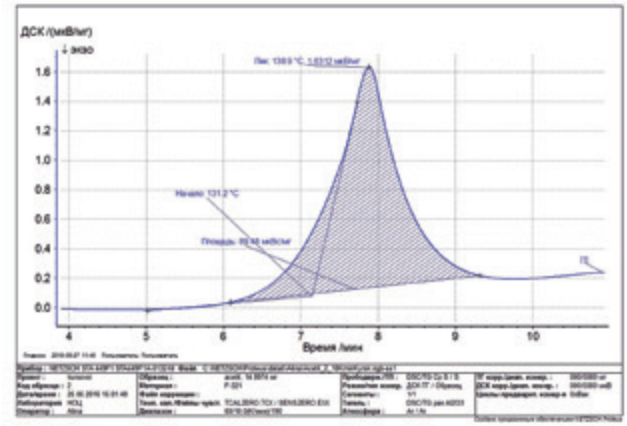


Рисунок 4. Образец 3

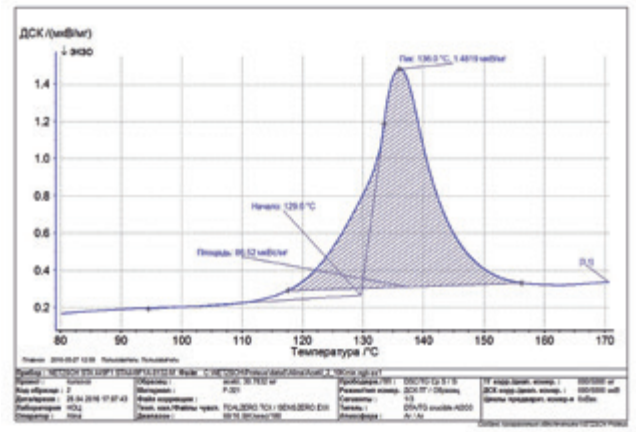


Рисунок 5. Образец 4

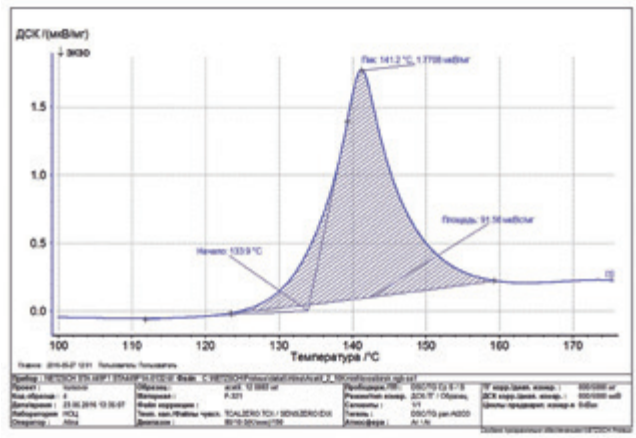


Рисунок 6. Образец 5

содержании ацетилсалициловой кислоты в исследуемых образцах.

С помощью программного обеспечения синхронного термоанализатора Proteus Analyzer были рассчитаны площади пиков и отмечена температура их фиксирования на графиках. Результаты для всех образцов приведены в таблице 1.

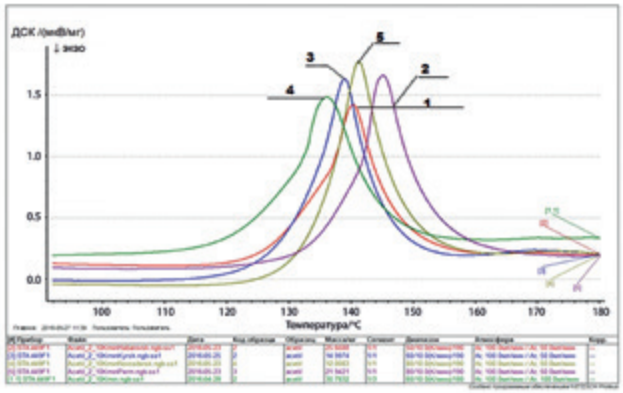


Рисунок 7. Зависимость теплоёмкости от температуры для 5 исследуемых образцов

На основании ДСК-измерений при 10 К/мин было рассчитано значение суммарной энтальпии процесса. Для нахождения процентного (по весу) содержания ацетилсалициловой кислоты в пробе величина $\Delta H_{проб}$ делилась на $\Delta H_{чист}$, представляющую собой сумму теплоты плавления и разложения ацетилсалициловой кислоты и согласно литературным данным [5] равную 107,09 Дж/г.

$$\omega\ (\%) = (\Delta H_{проб}/\Delta H_{чист}) \cdot 100\%$$

$$\omega\ (\%) = (89{,}83/107{,}09) \cdot 100\% = 83{,}88\%\ \text{(образец 1)},$$

$$\omega\ (\%) = 82{,}75\%\ \text{(образец 2)},$$

$$\omega\ (\%) = 83{,}55\%\ \text{(образец 3)},$$

$$\omega\ (\%) = 80{,}78\%\ \text{(образец 4)},$$

$$\omega\ (\%) = 85{,}49\%\ \text{(образец 5)}.$$

Таблица 1.

Результаты дифференциального термического анализа для различных образцов лекарственных препаратов

№ образца	T, °C	ΔH разложения, Дж/г	$\omega_{ср}$, вес, %
1	140,30	89,83	83,88
2	145,10	88,63	82,75
3	138,90	89,48	83,55
4	136,00	86,52	80,78
5	141,20	91,56	85,49

Из таблицы 1 следует, что наибольшее содержание ацетилсалициловой кислоты – в образце 5 производства новосибирского ЗАО «Производственная фармацевтическая компания Обновление» (85,49%), а наименьшее – в образце 4 казанского ОАО «Татхимфармпрепараты» (80,78%), что соответствует норме ГФ XIII [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом ДСК определено количество активного компонента лекарственных препаратов – ацетилсалициловой кислоты для пяти образцов различных производителей;

Установлено, что количество ацетилсалициловой кислоты в этих препаратах равно 80–85 мас.%, что отвечает нормативной базе ГФ XIII;

Метод ДСК может быть использован для разработки методики контроля качества лекарственных препаратов, содержащих ацетилсалициловую кислоту, что планируется сделать в дальнейших работах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ацетилсалициловая кислота // Государственная фармакопея, XIII изд. Т. 3. / МЗ РФ. – М.: ФЭМБ, 2015. С. 33.
2. А.А. Лузин. Применение физико-химических методов для стандартизации и контроля качества лекарственных средств, относящихся к карбоновым кислотам и их производным: автореф. дис. … к. фарм. н. – Москва. 2008. 13 с.
3. А.В. Фонякин. Ацетилсалициловая кислота в лечении и профилактике ишемического инсульта // Регулярные выпуски «РМЖ». 2013. № 30. С. 1567.
4. В.В. Косенко, С.А. Тарасова. Организация государственного контроля качества лекарственных средств на базе федеральных лабораторных комплексов // Вестник Роспотребнадзора. 2012. № 6. С. 17–28.
5. E. Marti, E. Kaisersberger, G. Kaiser, W.-Y. Ma. Thermoanalytical Characterization of Pharmaceuticals // NETZSCH Annual. 2000.

Организатор

Pharmcontract group of companies

Генеральный информационный партнер

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Участие в семинаре БЕСПЛАТНОЕ!

В рамках семинара известные ученые и биотехнологи из GE Healthcare расскажут о современном состоянии и тенденциях развития биофармацевтики

Для всех участников семинара предусмотрены подарки: первое полномасштабное издание для биотехнологов – «Красная» биотехнология: от науки к промышленности»

18 ноября 2016 г. с 15.00-17.00

Место проведения:

г. Москва, МВЦ "Крокус Экспо", павильон 2, зал 7, Стенд **A373**

По вопросам участия обращайтесь в Пресс-службу ГК «Фармконтракт» по тел.: **+7 (495) 252-00-98** или по e-mail: **infopress@phct.ru**

УДК 543.865/.867

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

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

* адресат для переписки:
E-mail: trineevaov@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ТИМЬЯНА: СОСТАВ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ (ОБЗОР)

О.А. Винокурова[1], О.В. Тринеева[1]*, А.И. Сливкин[1]

Резюме. На территории европейской части России наряду с тимьяном ползучим произрастает около 20 близких видов, которые в природных условиях не различаются заготовителями и используются наравне с тимьяном ползучим. Анализ научной литературы показал, что до недавнего времени при изучении химического состава травы чабреца различных видов основное внимание обращалось на определение весьма ограниченного набора биохимических показателей, характеризующих главным образом количественное содержание эфирных масел и их компонентный состав, в то время как другие биологически активные вещества (БАВ) исследовались недостаточно. Имеющаяся информация по составу БАВ носит фрагментарный характер и, как правило, отражает результаты краткосрочных наблюдений, относится к разным географическим областям и получена в разные годы по разным методикам анализа, что затрудняет сравнение количественных содержаний определенных соединений. Проведенный анализ в целом показал значительное сходство в составе БАВ травы тимьяна различных видов. Это позволяет использовать в медицине другие виды, произрастающие на различных территориях, а также решить проблему рационального использования природных ресурсов и уйти от необходимости культивирования тимьяна ползучего на ограниченной географией территории России. Ряд исследований показали, что нефармакопейные виды тимьяна также обладают выраженной противовоспалительной активностью. В то же время эфирное масло травы различных видов тимьяна характеризуется индивидуальным составом компонентов, что наряду с микродиагностическими признаками может быть использовано для целей идентификации.

Ключевые слова: трава тимьяна ползучего, тимьяна Маршалла, тимьяна обыкновенного, тимьяна Палласа, тимьяна блошиного, тимьяна двуликого, тимьяна крымского, тимьяна мелового, состав, свойства.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF DIFFERENT TYPES OF THYME: THE COMPOSITION, PROPERTIES AND APPLICATION (REVIEW)

O.A. Vinokurova[1], O.V. Trineeva[1]*, A.I. Slivkin[1]

Abstract. On the territory of the European part of Russia along with creeping thyme grows about 20 closely related species, which do not differ loggers in nature and are used along with creeping thyme. Analysis of the scientific literature reveals that until recently the study of the chemical composition of herb thyme various kinds main attention was paid to the definition of a very limited set of biochemical parameters characterizing mainly quantitative content of essential oils and their composition, whereas the other biologically active substances. We studied enough. Available information on the composition of biologically active substances is fragmented and, as a rule, reflects the results of short term observation relates to the different geographical areas and received at different times by different methods of analysis, which complicates the comparison of quantitative content of certain compounds. The analysis generally showed significant similarity in composition of the biologically active substances of various kinds of herb thyme. This allows you to use other types of medicine that grow in different areas, as well as solve the problem of rational use of natural resources and the need to move away from the culture creeping thyme in a limited geography in Russia. A number of studies have shown that informal types of thyme also have a pronounced anti-inflammatory activity. At the same time, essential oil of different kinds of herb thyme composition characterized by individual components, which, along with microscopic features can be used for identification purposes.

Keywords: grass creeping thyme, thyme Marshall, *Thymus vulgaris*, thyme Pallas, flea thyme, thyme two-faced, Crimean thyme, thyme Cretaceous, composition, properties.

ВВЕДЕНИЕ

К семейству яснотковых относится около 3500 видов. Особенно многочисленны и разнообразны губоцветные в странах Средиземноморья, в горных районах, в тропиках Центральной и Южной Америки. Для таежной зоны характерно относительно небольшое разнообразие губоцветных. На территории бывшего СССР их более 800 видов. Многие представители семейства внедрены в культуру как эфиромасличные и лекарственные растения.

Внимание исследователей издавна привлекает растения рода *Thymus* L., представители которого являются источником лекарственного растительного сырья (ЛРС), обладающего широким спектром действия. Разрешенными к медицинскому применению в России являются такие виды тимьяна, как тимьян ползучий *Thymus serpyllum* L. и тимьян обыкновенный *Thymus vulgaris* L. [1]. Тимьян обыкновенный произрастает в странах Средиземноморья. Основной ареал тимьяна ползучего сосредоточен в Европейской части России, но

ресурсы его сильно истощены. В настоящее время на территории областей Центрального Черноземья чабрец встречается единично, но наряду с ним в указанных областях произрастает около 7–8 близких видов, основными из которых являются тимьян Маршалла, тимьян блошиный, тимьян меловой, тимьян Палласа [2].

При сборе сырья чабреца заготовители, как правило, не различают виды, поэтому в сырье наряду с тимьяном ползучим и вместо него могут быть другие виды, широко распространенные в данном регионе, и их сочетание в различных соотношениях [2]. Однако виды тимьяна, распространенные в средней полосе европейской части России, относятся к различным секциям и подсекциям и, естественно, различаются по химическому составу, в том числе по содержанию и качественному составу эфирного масла, как одного из основных классов биологически активных веществ (БАВ) растений рода тимьян [2–5]. Поэтому исследования по сравнительному фармакогностическому изучению травы тимьяна различных видов следует считать актуальными.

В связи с вышесказанным целью работы является сравнительное изучение макро- и микроскопических признаков, состава, свойств и возможностей применения в медицине травы тимьяна различных видов.

БОТАНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ТИМЬЯНА

Род *Thymus* представляет собой очень сложную в систематическом отношении группу. Постоянно приходится сталкиваться с существованием большого числа трудноразличимых форм. Одни авторы выделяют множество мелких видов, а другие предлагают определить их в подвиды и гибридогенные формы. Характеристика видов остаётся весьма сложной в силу изменчивости не только химических, но и морфологических признаков вида рода [6] (таблица 1).

Таблица 1.

Морфологические особенности некоторых видов рода *Thymus* L. [6–9]

Морфологические признаки	Вид			
	Тимьян ползучий	Тимьян обыкновенный	Тимьян Маршалла	Тимьян Палласа
Цветок (венчик)	Ярко-розово-фиолетовый, 6–8 мм длиной	Двугубый, нижняя губа глубоко рассечена на три дольки, снаружи покрыт короткими волосками	Бледно-розовый, ворончатый, двугубый, с выемчатой на верхушке верхней губой и отклонённой трёхлопастной нижней	Ярко-розовый, редко белый, длиной до 7 мм, с короткой трубкой
Цветок (чашечка)	Узкоколокольчатая, 4–4,5 мм длиной	Колокольчатая, 3–5 мм длиной, с короткими волосками и треугольными зубчиками в зеве	Колокольчатая, длиной около 2,5 мм, с пятью почти одинаковыми остроугольными зубцами, длиннореснитчатыми по краю	Лиловатая, узкоколокольчатая, длиной 3,5–4 мм, двугубая, с тремя мелкими остротреугольными зубчиками с плёнчатым краем на верхней губе и двумя узкими острыми, серповидно изогнутыми зубцами нижней губы
Соцветие	Довольно плотно головчатое, цветоножки значительно короче чашечки, коротковолосистые	Цветки собраны в мутовки, в пазухах листьев – в полумутовки	Цилиндрическое, в нижней части прерывистое, ось соцветия мохнатая	Цветки в головчатых компактных соцветиях
Листья	Супротивные, мелкие, овальные, яйцевидные или ланцетные, цельнокрайние, короткочерешковые, с хорошо заметными в лупу эфиромасличными железками	Очень мелкие (длиной всего 0,5–1 см), темно-зеленого цвета, расположены супротивно, крепятся на коротких черешках, по форме продолговато-ланцетные, цельнокрайние, к низу загнуты. Листовая пластинка покрыта точечками-железками	Продолговато-овальные, продолговатые или ланцетные, длиной 8–20 мм и шириной 1,5–10 мм, голые или рассеянно волосистые, по краю лишь у основания с редкими ресничками, боковые жилки незаметные, точечные желёзки многочисленные, но очень мелкие и малозаметные	Плотные, жёсткие, с сильно выступающими жилками на нижней стороне, линейные, длиной 8–15 мм и шириной 0,7–2,5 мм, сидячие, с точечными желёзками и ресничками по краю от основания до середины пластинки. В пазухах стеблевых листьев обычны пучки хорошо развитых пазушных листьев
Стебли	Стелющийся по земле, местами дающий придаточные корни, ветвистый, в нижней части одревеснеющий, с многочисленными восходящими вегетативными и генеративными веточками	Прямостоячий или восходящий, в нижней части древеснеет, сильноветвистый. Все ветви тимьяна травянистые, четырехгранные, покрыты сероватым опушением, имеют укороченные боковые побеги	Опушены относительно равномерно по всем граням (опушение отстоящими волосками особенно заметно под соцветием)	С толстоватыми стволиками, заканчивающимися соцветиями, и короткими стелющимися бесплодными побегами; цветоносные побеги под соцветием опушены короткими прижатыми волосками, вниз направленными
Жизненная форма	Полукустарничек, высотой 2–10 см	Полукустарничек, высотой 20–30 см	Полукустарничек, высотой 10–25 см	Полукустарничек, высотой 8–15 см

МИКРОДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО

Учеными Первого МГМУ им. И.М. Сеченова подробно описаны основные микроскопические признаки официнального вида тимьяна (таблица 2) в цельном и порошкованном виде [10, 11]. Основные отличительные особенности других видов тимьяна, позволяющие однозначно определить видовую принадлежность, в литературе описаны недостаточно.

Таблица 2.

Микродиагностические признаки тимьяна ползучего [10,11]

№ п/п	Микродиагностический признак	Характеристика
Лист (дорсовентральное строение)		
1	Эпидермис	Клетки верхней и нижней стороны с извилистыми стенками
2	Устьица	Длина 21–25 мкм, ширина 12–17 мкм; расположены на нижнем эпидермисе с частотой 70–192 на 1 мм^2, на верхнем – 70–174 на 1 мм^2
3	Устьичный аппарат	Диацитный тип. Устьичные клетки чечевицевидные
4	Желёзки	На короткой ножке с 8 выделительными клетками, расположенными радиально
5	Волоски	Три типа: простые остроконусовидные, очень крупные, многоклеточные, бородавчатые, расположенные у основания листа (длиной до 1360 мкм); по краю и на пластинке листа более мелкие остроконусовидные прямые и наклоненные к поверхности листа волоски длиной до 250 мкм; головчатые волоски на короткой одноклеточной ножке, с овальной одноклеточной головкой (диаметр головки 12–17 мкм)
6	Выросты эпидермиса	Сосочковидные гладкие или слабобородавчатые, чаще встречаются на верхней стороне листа и по краю
Стебель		
1	Клетки эпидермиса	С прямыми стенками, вытянуты по длине стебля, длиной 17–58 мкм, шириной 12–25 мкм
2	Устьица, железки, волоски	На поверхности встречаются устьица, желёзки, головчатые и простые волоски, почти такие же, как на листе
Чашелистик		
1	Эпидермис	С верхней и нижней стороны со слабоизвилистыми стенками, около жилок клетки более вытянуты. С верхней стороны клетки длиной 25–54 мкм, шириной 12–21 мкм; с нижней – длиной 29–62 мкм, шириной 8–21 мкм
2	Кутикула	Сильноморщинистая с верхней стороны чашелистика и морщинистая с нижней стороны
3	Устьичный аппарат	Диацитный тип
4	Железки и волоски	Желёзки и головчатые волоски такие же, как на листе
Лепесток		
1	Эпидермис	С извилистыми стенками, в середине и на верхней части лепестка с сосочковидными выростами
2	Железки и волоски	С нижней и верхней стороны лепестка встречаются желёзки, головчатые волоски, такие же как на листе. Простые волоски одноклеточные булавовидные с верхней стороны (длиной до 167 мкм) в основном у основания лепестка в форме лопастей (расширенные к верхушке волоска), с нижней стороны (длиной до 292 мкм) такие же, как на листе, многоклеточные конусовидные
Пыльца		
1	Форма, размер и характер поверхности	Овальная, округлая, 4–6-гранная, шероховатая, 4–6-бороздная, диаметром 30–40 мкм

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО

Трава растения содержит до 0,6% эфирного масла, основным компонентом которого является тимол (до 42%). Кроме того, эфирное масло содержит карвакрол, n-цимол, α-терпинеол, борнеол. В траве также обнаружены дубильные вещества (до 7,4%), горечи, камедь, тритерпеновые соединения – урсоловая и олеаноловая кислоты, флавоноиды, большое количество минеральных солей. В зрелых семенах содержится 33,6% жирного масла [12, 13]. Тимьян также содержит множество флавоноидных фенольных и каротиноидных антиоксидантов, в том числе зеаксантин, лютеин, апигенин, нарингенин, лутеолин [14].

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО И ТИМЬЯНА ОБЫКНОВЕННОГО

Трава тимьяна входит в состав многих ЛС, сборов, а также монокомпонентных форм на его основе [12–15]. Распространенность данного вида сырья связана с включением его в отечественные и зарубежные нормативные документы (НД).

Таблица 3.

Сравнительная характеристика показателей качества тимьяна ползучего в различных НД [16-18]

№ п/п	Показатель качества	ГФ XI	ГФ XIII	ГФ республики Беларусь
1	Внешние признаки (цельное сырье)	+	+	+
2	Внешние признаки (измельченное сырье)	–	+	–
3	Микроскопия	+	+	+
4	Определение основных групп БАВ	–	ТСХ	ТСХ
Допустимые примеси				
5	Несырьевые части растений	+	+	+
6	Органические примеси	не более 1%	не более 1%	не более 2%
7	Минеральные примеси	не более 1%	не более 1%	не более 2%
8	Тяжелые металлы	–	+	–
9	Радионуклиды	–	+	–
10	Микробиологическая чистота	–	+	–
11	Остаточные количества пестицидов	–	+	–
12	Влажность	не более 13%	не более 13%	не более 100 мл/кг
13	Общая зола	не более 12%	не более 12%	не более 15%
14	Зола, нерастворимая в растворе хлористово-дородной кислоте	не более 5%	не более 5%	не более 3%
15	Измельченность сырья	–	+	–
Количественное определение БАВ				
16	Определение эфирного масла	–	–	+
17	Определение содержания тимола и карвакрола	–	–	+
18	Определение содержания летучих фенолов	–	–	+
19	Экстрактивные вещества, извлекаемые водой	–	не менее 18%	–
20	Экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом 30 %	не менее 18%	не менее 18%	–
21	Определение суммы флавоноидов	–	не менее 0,9%	–
22	Хранение	–	+	+
23	Упаковка, маркировка, транспортировка	+/–	+	–

Тимьян ползучий включен в издания с I по VII и XI ГФ СССР, в XIII издание ГФ России, а также в Государственный реестр ЛС 2004 и 2008 года. Стандартизация травы тимьяна ползучего в различных НД осуществляется по показателям, приведенным в таблице 3. Тимьян обыкновенный включен в издания с I по IX и XI ГФ СССР, а также в Государственный реестр ЛС 2004 и 2008 года. Стандартизация травы тимьяна обыкновенного в различных НД осуществляется по показателям, приведенным в таблице 4.

Таблица 4.

Сравнительная характеристика показателей качества тимьяна обыкновенного в различных НД [16,19]

№ п/п	Показатель качества	ГФ XI	Европейская Фармакопея, 2008
1	Внешние признаки (цельное сырье)	+	+
2	Внешние признаки (измельченное сырье)	–	+
3	Микроскопия	+	–
4	Определение основных групп БАВ	–	ТСХ
Допустимые примеси			
5	Несырьевые части растений	+	+
6	Органические примеси	не более 2%	–
7	Минеральные примеси	не более 2%	–
8	Тяжелые металлы	–	+
9	Радионуклиды	–	+
10	Остаточные количества пестицидов	–	+
11	Влажность	не более 13%	не более 100 мл/кг
12	Общая зола	не более 12%	не более 15%
13	Зола, нерастворимая в растворе хлористоводородной кислоты	–	не более 3%
14	Измельченность сырья	–	+
Количественное определение БАВ			
16	Определение эфирного масла	не менее 1%	+
17	Определение содержания тимола, карвакрола, цинеола и линалаола	–	+
22	Хранение	+	–
23	Упаковка, маркировка, транспортировка	+/–	–

Также тимьян ползучий и тимьян обыкновенный включены в следующие зарубежные фармакопеи: Европейскую Фармакопею VI издания, Немецкую Фармакопею 2008 г., Британскую травяную фармакопею 1991, 1996 гг., Британскую Фармакопею 2008 г., Французскую Фармакоп X издания [25].

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЭФИРНОГО МАСЛА РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ТИМЬЯНА

В траве растений рода тимьян содержится эфирное масло, в состав которого входят ароматические терпены: тимол, карвакрол; монотерпены, сесквитерпены, содержание которых сильно варьирует в зависимости от места произрастания, места обитания, высоты над уровнем моря, фазы развития растения и др. [20]. Выделяют более 8 хемотипов эфирного масла растений рода тимьян (таблица 5), в одном из них преобладающими компонентами являются тимол и карвакрол, в другом преобладает α-терпениол, в третьем – гераниол и т.д. [2, 21].

Для представителей рода *Thymus* L. характерен полиморфизм компонентного состава эфирных масел как на межвидовом, так и на внутривидовом уровне. Например, в эфирных маслах тимьянов различных видов северных широт карвакрола (21–37%) содержится больше, чем тимола (10–17%) [21]. Также известен хемотип масла тимьяна с содержанием порядка 33% линалоола и его ацетата. Для тимьяна блошиного (*Th. pulegioides*) авторы указывают на наличие восьми его хемотипов, различающихся составом эфирного масла [26]. На территории Алтая выявлено два хемотипа *Th. serpyllum*, в которых варьирует соотношение тимола, карвакрола и неролидола. В Поволжье изучены представители рода *Thymus* L., произрастающие только в Волгоградской области. Для этого региона выявлены виды тимольного хемотипа (*Th. marschallianus, Th. kirgisorum*) с содержанием тимола от 30 до 65% и виды со значительным количеством нераля, гераниаля, гераниола (*Th. calcareous, Th. kirgisorum* var *creticola*) [1].

В эфирном масле тимьяна Маршалла обнаружено 23 индивидуальных компонента, 22 из которых идентифицированы, содержание соединения неизвестной структуры составляет 2,65% [1]. Основными компонентами эфирного масла *Th. marschallianus* являются ароматические монотерпены n-цимен (20,99%) и тимол (54,61%) на фоне очень малого количества карвакрола (2,92%), следовательно, эфирное масло тимьяна Маршалла можно отнести к фенольному типу. Суммарная доля основных компонентов в масле составила 75,60% [1]. Относительно базовых компонентов эфирное масло тимьяна Маршалла сходно по химическому составу с эфирным маслом тимьяна обыкновенного и тимьяна ползучего, основными веществами эфирных масел которых являются тимол, карвакрол, n-цимен. Аналогичное содержание тимола в эфирном масле тимьяна Маршалла Волгоградской области (49–55%), хотя и с меньшим содержанием n-цимена (7–9%), в эфирном масле *Th. marschallianus*, произрастающего в Казахстане, тимола содержится 42,47–70,91%, при этом карвакрол, n-цимен не обнаруживаются. Также достаточно высокое содержание тимола (46,9%) обнаруживается у тимьяна гобийского, произрастающего в Монголии [1].

Таблица 5.

Сравнительная характеристика компонентного состава эфирного масла чабреца в зависимости от условий произрастания [7, 22–24]

Происхождение	Хемотип
Финляндия	1 – монотерпеновые углеводороды (33%), 1,8-цинеол (12,5–15,0%), гермакра-1(10),5-диен-4-ол (3–12%), гермакрен D (10,0–12,0%), гермакра -1(10), 4-диен-6-ол; 2 – монотерпеновые углеводороды (30%), 1,8-цинеол (26%), в-кариофиллен, гермакрен D, гедикариол; 3 – монотерпеновые углеводороды (27%), 1,8-цинеол (19%), гермакрен D, β- кариофиллен, камфора
Финляндия	1 – линалоол (21,9–43,8%), линалилацетат (8,9–17,6%), β-кариофиллен,1,8-цинеол, камфора; 2 – 1,8-цинеол (17,2–27,6%), мирцен (15,4–22,4%), β-кариофиллен (6,8–19,1%), камфора, линалоол
Литва	1,8-цинеол (16,3–19,0%), β-кариофиллен (9,6–11,3%), мирцен (9,7–10,7%), гермакрен D, камфора
Венгрия	Карвакрол (39,5–45,9%), тимол, р-цимен, линалоол, нерол
Украина	1 – тимол (35,1–50,0%), γ-терпинен (12,7–18,0%), р-цимен (8,6–14,1%); 2 – карвакрол (48,4–55,2%), γ-терпинен (10,1–27,1%), р-цимен (7,1–8,0%)
Кавказ	1 – тимол (76,1–81,5%), р-цимен, карвакрол, β- кариофиллен, а-терпинеол; 2 – карвакрол (49,0–62,0%), тимол (21,5–29,7%), р-цимен, β-кариофиллен, а-терпинеол
Пакистан	Тимол (42,6%), р-цимен, карвакрол, борнеол, терпенен-4-ол
Индия	Карвакрол (49,4%), р-цимен, тимол, зингиберен, евгенол
Индия	Тимол (57,6%), р-цимол (20,0%), γ-терпинен, зингиберен, борнеол
Китай	Тимол (23,9%), 2,4,5-триметилбензиловый спирт (16,9%), р-цимен (16,3%), карвакрол (10,6%), о-бутилфенол

В эфирном масле тимьяна Палласа обнаружено 20 индивидуальных компонентов, из них идентифицировано 19, содержание соединения неизвестной струк-

туры составляет 3,4% [1,27]. Основными компонентами эфирного масла *Th. pallasianus* являются моноциклические монотерпены: α-терпиненилацетат (48,5%) и транс-α-терпинеол (32,8%), в связи с этим масло тимьяна Палласа можно отнести к нефенольному типу. Суммарная доля доминирующих компонентов в масле составила 81,3%. Высокое содержание монотерпеновых спиртов может отвечать за антисептическое действие эфирного масла *Th. pallasianus*. В малых количествах содержатся тимол (0,40%) и карвакрол (0,10%). Низкое содержание ароматических монотерпенов обнаруживается в сырье *Th. pallasianus* Волгоградской области, *Th. talijevii*, произрастающего на территории Республики Коми, *Th. petraeus* из Республики Хакасии [1].

Для обоих видов тимьяна характерно небольшое содержание сесквитерпеноидов, из которых общим компонентом является спатуленол. Из монотерпеновой фракции и в тимьяне Маршалла, и в тимьяне Палласа встречается линалоол, содержание которого в *Th. pallasianus* в 6 раз больше, чем в другом виде [1].

Выявленные различия в химическом составе эфирных масел упомянутых выше тимьянов могут быть обусловлены как генетическими особенностями видов, так и экологическими условиями произрастания этих растений. Известно, что тимьян Маршалла произрастает в степях, на сухих полянах и опушках, а тимьян Палласа – в черноземной зоне, на приречных песках, в песчаных степях. Эфирные масла исследуемых видов близки по составу к эфирным маслам официнальных видов тимьянов, что требует более детального исследования фармакологических свойств ЛРС тимьяна Маршалла и тимьяна Палласа и открывает перспективу применения этих растений в фармацевтической отрасли [1].

Изучен компонентный состав эфирного масла травы тимьяна блошиного, произрастающего на территории Брянской области, и тимьяна двуликого, произрастающего на территории Курской области [2]. В результате установлено, что содержание эфирного масла в траве тимьяна блошиного накапливается до 0,95%, а в траве тимьяна двуликого достигло 0,15% [2]. Установлен качественный и количественный состав эфирного масла травы чабреца обыкновенного и крымского. Доказано, что эфирное масло чабреца крымского содержит более высокие количественные показатели качества [28]. Исследован химический состав эфирного масла травы тимьяна байкальского, произрастающего на территории России (Забайкальский край, Республика Бурятия, Иркутская область) и Монголии. По составу эфирного масла тимьян байкальский близок к тимьяну ползучему и относится к хемотипу карвакрола [29]. Сравнительная характеристика компонентного состава эфирных масел различных видов тимьяна представлена в таблице 6.

Выявленные закономерности позволяют установить вид тимьяна по компонентному составу эфирного масла, полученного из его травы. Таким образом, маркерными компонентами для эфирного масла тимьяна Маршалла являются следующие: n-цимен, ацетилтимол, α-копаен, гераниолацетат, кариофиллен, τ-муролен, леден, β–кадинен; для тимьяна Палласа: α-терпиненилацетат, транс-α-терпинеол, z-муролен, нерол, неролидол, хедикариол, τ-каданол, ледена оксид; для тимьяна Блошиного: метилтимол, эвгенол, β-кубенен, α–аморфен, α-муролен; для тимьяна обыкновенного: α-туйон; для тимьяна крымского: аллоаромадендрен; для тимьяна двуликого: Z-цитраль, геранилпропионат, нерилацетат, гермакрен-В, изомеры кариофиллена, β-ионон, фарнезол, изоспатуленол, аромадендрен, цис- и транс-оцимен; для тимьяна байкальского: α-камфоленаль, борнилацетат, борнилформиат, β-копаен, цис-пинокарвеол, цитранеллол, производные изокариофиллена, γ-муролен, α-каданол, сабинен, периллен, миртенол, δ-аморфен, туйон-3, цис-п-ментен-1-ол.

В научной литературе встречается большое количество работ, посвященных оценке содержания эфирных масел в различных частях растений чабреца разных видов [32]. Обычно используют сухие растения как в качестве сырья для получения эфирного масла, так и в качестве лекарственного и пряного сырья. В этом случае иногда значительная часть листьев и цветков осыпается и соотношение стеблей к листьям изменяется, что сказывается на содержании эфирного масла в используемом сырье. Содержание эфирного масла в целом сырье и в его отдельных частях показано в таблице 7 [32].

С увеличением содержания листьев в смеси из листьев и стеблей чабреца горного и тимьяна ползучего увеличивается и эфиромасличность сырья, то есть большая облиственность растений в фазе цветения увеличивает и содержание эфирного масла. Зависимость выхода эфирного масла от содержания листьев в сырье, по данным авторов, является линейной [32]. Таким образом, основное количество эфирного масла содержится в листьях растения. Его главными компонентами являются фенолы: тимол и карвакрол для чабреца горного и тимол для тимьяна ползучего.

Ряд исследований суммарного содержания эфирных масел в свежесобранном чабреце, а также в высушенном воздушно-теневым способом сырье, собранном в разные фазы фенологического развития растения (таблица 8) [12], показали, что потери эфирного масла после сушки составляют примерно 0,04–0,12%.

Осенью, перед уходом растений в зимнее состояние покоя, наблюдается небольшое повышение содержания эфирных масел в надземной части тимьяна, в среднем на 0,04% [20, 33]. Дальнейшее детальное изучение эфирных масел тимьяна не только ценно для лекарственного их использования, но и важно в раскрытии сложных вопросов систематики рода *Thymus* [12, 33].

Таблица 6.

Изучение компонентного состава эфирных масел различных видов тимьяна [1,2,28,29]

№ п/п	Название компонента	Содержание компонентов в % от суммы цельного эфирного масла тимьяна, мг/кг						
		Маршалла	Палласа	Блошиный	Обыкновенный	Крымский	Байкальский	Двуликий
1	α-терпиненилацетат	–	48,50	–	–	–	–	–
2	*п*-цимен	20,99	–	–	–	–	–	–
3	β-цимен	–	–	–	–	–	–	13,82
4	*п*-цимол	–	–	–	27,64	19,68	0,76	–
5	цис-*а*-терпинеол	–	2,50	–	–	0,18	–	–
6	*а*-терпинен	3,83	–	–	–	–	0,22	–
7	камфора	–	0,40	–	6,27	2,62	2,19	10,79
8	α-камфоленаль	–	–	–	–	–	0,08	–
9	линалоол	1,04	6,50	0,26	6,25	2,51	0,56	131,39
10	линалоолоксид	–	–	–	–	–	–	6,32
11	борнеол	1,91	–	1,86	5,78	1,76	17,83	5,61
12	борнилацетат	–	–	–	–	–	6,51	–
13	борнилформиат	–	–	–	–	–	0,18	–
14	терпенеол-4	2,33	–	–	–	–	1,56	–
15	α-терпинеол	–	–	–	0,19	–	30,91	–
16	γ-терпинолен	–	–	–	2,17	0,10	0,27	–
17	вещество А неизвестной структуры	–	3,4	–	–	–	–	–
18	*п*-мент-1-ен-8-ол	0,42	–	–	–	–	–	–
19	цис-*п*-ментен-1-ол	–	–	–	–	–	0,08	–
20	вещество Б (C_{12} $H_{22}O$)	2,65	–	–	–	–	–	–
21	транс-а-терпинеол	–	32,8	–	–	–	–	–
22	z-муролен	–	0,70	–	–	–	–	–
23	Е-цитраль	–	0,70	–	–	–	–	444,13
24	Z-цитраль	–	–	–	–	–	–	368,43
25	гераниол	0,99	1,30	–	–	–	–	62,10
26	геранилацетат	–	0,90	–	–	–	–	46,44
27	геранилпропионат	–	–	–	–	–	–	25,77
28	ацетилтимол	0,12	–	–	–	–	–	–
29	а-копаен	0,10	–	–	–	–	–	–

Продолжение таблицы 6

№ п/п	Название компонента	Содержание компонентов в % от суммы цельного эфирного масла тимьяна, мг/кг						
		Маршалла	Палласа	Блошиный	Обыкновенный	Крымский	Байкальский	Двуликий
30	β-копаен	–	–	–	–	–	0,10	–
31	нерол	–	0,20	–	–	–	–	–
32	нерилацетат	–	–	–	–	–	–	13,58
33	гераниолацетат	0,19	–	–	–	–	–	–
34	транс-карвеол	–	0,07	–	–	–	0,10	–
35	цис-пинокарвеол	–	–	–	–	–	0,19	–
36	цитранеллол	–	–	–	–	–	0,43	–
37	кариофиллен	1,25	–	–	–	–	–	–
38	эпи-9-изокариофиллен	–	–	–	–	–	1,01	–
39	изокариофиллен-12-ацетокси	–	–	–	–	–	0,13	–
40	2-хлоро-4,6ди(2 тиазолил) пирамидин	0,63	–	–	–	–	–	–
41	тимол	54,61	0,40	2,03	–	39,72	–	–
42	метилтимол	–	–	0,11	–	–	–	–
43	т-муролен	0,41	–	–	–	–	–	–
44	γ-муролен	–	–	–	–	–	0,10	–
45	карвакрол	2,92	0,10	41,03	–	7,57	0,16	23,22
46	метилкарвакрол	–	–	2,15	1,23	–	–	–
47	гермакрен-D	0,18	–	0,73	–	0,09	1,31	8,78
48	гермакрен- B	–	–	–	–	–	–	15,28
49	бициклогермакрен	–	–	0,46	0,73	0,07	0,11	–
50	леден	0,50	–	–	–	–	–	–
51	кариофиллена оксид	–	0,10	0,94	0,20	0,20	0,72	110,24
52	β-бисаболен	1,58	–	3,81	–	–	0,09	92,56
53	β –кадинен	0,21	–	–	–	–	–	–
54	δ-кадинен	0,56	–	0,95	0,80	0,54	–	–
55	γ – кадинен	–	–	0,17	–	–	0,15	–
56	α-кадинол	–	–	–	–	–	0,10	–
57	сабинен	–	–	–	–	–	0,55	–
58	периллен	–	–	–	–	–	0,51	–

Продолжение таблицы 6

№ п/п	Название компонента	Содержание компонентов в % от суммы цельного эфирного масла тимьяна, мг/кг						
		Маршалла	Палласа	Блошиный	Обыкновенный	Крымский	Байкальский	Двуликий
59	гумулен	0,34	–	0,37	0,07	0,16	0,06	–
60	неролидол	–	0,85	–	–	–	–	–
61	хедикариол	–	0,10	–	–	–	–	–
62	спатуленол	0,71	0,20	0,64	–	–	–	50,23
63	изоспатуленол	–	–	–	–	–	–	7,65
64	т-кадинол	–	0,10	–	–	–	–	–
65	ледена оксид	–	0,05	–	–	–	–	–
66	1-октен-3-ол	–	–	1,65	–	–	–	8,68
67	γ-терпинен	–	–	0,04	–	4,49	0,63	–
68	транс-сабиненгидрат	–	–	0,55	–	–	0,08	–
69	цис-сабиненгидрат	–	–	–	–	0,36	0,07	–
70	терпинен-4-ол	–	–	0,01	0,76	0,71	–	–
71	терпинен-1-ол	–	–	–	0,06	0,11	–	–
72	эвгенол	–	–	1,09	–	–	–	–
73	миртенол	–	–	–	–	–	0,14	–
74	β-бурболен	–	–	0,16	–	–	0,21	8,37
75	β-кариофиллен	–	–	6,39	0,95	3,72	–	–
76	транс-кариофиллен	–	–	–	–	–	–	13,93
77	α-кариофиллен	–	–	–	–	–	–	3,60
78	β-кубенен	–	–	0,16	–	–	–	–
79	не идентифици-ровано	–	–	0,18	–	–	–	–
80	*а*-аморфен	–	–	0,50	–	–	–	–
81	δ-аморфен	–	–	–	–	–	0,22	–
82	*а*-муролен	–	–	0,17	–	–	–	–
83	цис-*а*-бисаболен	–	–	0,14	–	–	1,46	–
84	миристиновая кислота	–	–	0,09	–	–	–	–
85	гексагидрофар-незилацетон	–	–	0,05	–	–	–	–
86	пальмитиновая кислота	–	–	0,18	–	–	–	–
87	пентакозан	–	–	0,02	–	–	–	–

Окончание таблицы 6

№ п/п	Название компонента	Содержание компонентов в % от суммы цельного эфирного масла тимьяна, мг/кг						
		Маршалла	Палласа	Блошиный	Обыкновенный	Крымский	Байкальский	Двуликий
88	гептакозан	–	–	0,01	–	–	–	–
89	сквален	–	–	0,09	–	–	–	–
90	нонакозан	–	–	0,02	–	–	–	–
91	α-туйен	–	–	–	0,16	0,28	–	–
92	α-пинен	–	–	–	0,84	0,29	3,31	–
93	камфен	–	–	–	1,10	0,37	3,63	–
94	β-пинен	–	–	–	1,03	1,35	0,89	–
95	мирцен	–	–	–	0,76	0,65	11,58	–
96	3-октанол	–	–	–	0,15	0,15	–	–
97	α-фелландрен	–	–	–	1,10	0,06	–	–
98	γ-3-карен	–	–	–	0,98	0,64	–	–
99	лимонен	–	–	–	0,71	0,45	1,76	1,75
100	1,8-цинеол	–	–	–	3,15	1,15	3,47	–
101	α-туйон	–	–	–	0,21	–	–	–
102	β-туйон	–	–	–	0,24	0,04	–	–
103	туйон-3	–	–	–	–	–	0,12	–
104	лонгифолен	–	–	–	0,16	0,05	–	–
105	виридифлорол	–	–	–	0,34	1,93	–	–
106	тимол/карвакрол	–	–	–	22,48	–	–	–
107	аллоаромадендрен	–	–	–	–	0,08	–	–
108	аромадендрен	–	–	–	–	–	–	6,35
109	транс-оцимен	–	–	–	–	–	–	1,04
110	цис-оцимен	–	–	–	–	–	–	2,78
111	β-Ментен-3-ол	–	–	–	–	–	–	47,56
112	дец-1-ен	–	–	–	–	–	–	8,31
113	4-метил-2-(3-метил-2-бутенил)фуран	–	–	–	–	–	–	8,91
114	β-ионон	–	–	–	–	–	–	0,84
115	фарнезол	–	–	–	–	–	–	150,28
116	β-элемен	–	–	–	–	–	0,10	–
117	трициклен	–	–	–	–	–	0,21	–

Таблица 7.

Содержание эфирного масла в целом сырье и в его отдельных частях тимьяна горного и ползучего [32]

Растение	Содержание эфирного масла, %		
	Цельное сырье	Стебли и цветки	Листья
Тимьян горный	0,60±0,03	0,05±0,00	1,83±0,01
Тимьян ползучий	0,75±0,04	0,06±0,01	1,39±0,04

Таблица 8.

Содержание эфирного масла в свежем и сухом сырье *Thymus serpyllum* L. в разные фенофазы развития, % [12]

№ п/п	Фенофаза	Срок сбора	Свежее сырье	Сухое сырье
1	Вегетация до плодоношения	Конец мая	0,46 ± 0,52	0,39 ± 0,05
2	Цветение	Начало июня Середина июня Конец июня	0,57 ± 0,40 0,62 ± 0,30 0,66 ± 0,40	0,48 ± 0,12 0,50 ± 0,09 0,55 ± 0,02
3	Плодоношение	Середина июля Конец июля Середина августа	0,68 ± 0,32 0,45 ± 0,28 0,40 ± 0,20	0,59 ± 0,18 0,37 ± 0,20 0,36 ± 0,03
4	Вегетация после плодоношения	Начало сентября	0,44 ± 0,35	0,39 ± 0,06

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ТИМЬЯНА

Одна из групп действующих веществ растений рода тимьян обусловлена присутствием фенольных соединений [34]. Изучению фенольных соединений в траве тимьяна мелового в фазе цветения, широко распространенного в областях Центральной России, посвящен ряд исследований. Фенольные соединения исследуемого растения представлены флавоноидами, оксикоричными кислотами, кумаринами, дубильными веществами [34]. Выделение фенольных соединений осуществляют экстракцией 70% спиртом этиловым, растворитель отгоняют, очищают от липофильных примесей четыреххлористым углеродом. Очищенные водные экстракты фракционируют методом селективной экстракции диэтиловым эфиром, этилацетатом. Разделение смеси флавоноидов, оксикоричных кислот, кумаринов проводят методом препаративной хроматографии на колонках в сочетании с препаративной хроматографией на бумаге [34].

Структуру выделенных веществ устанавливают с использованием классических химических и физико-химических методов анализа на основании физико-химических свойств исходных соединений и продуктов их превращения, УФ- и ИК-спектров, величин R_f в различных системах растворителей [34].

Среди фенольных соединений интерес представляют дубильные вещества, обладающие противовоспалительной и антимикробной активностями, которые в растениях рода тимьян изучены мало [36]. Курскими учеными была проведена работа, посвященная изучению данного класса БАВ в траве следующих видов тимьяна, заготовленных в Курской, Орловской, Белгородской, Брянской и Воронежской областях в период массового цветения растений: тимьяна ползучего, тимьяна блошиного, тимьяна Маршалла, тимьяна мелового, тимьяна Палласа, тимьяна двуликого, тимьяна Черняева [36]. При проведении качественных реакций получили результаты, подтверждающие наличие в траве изучаемых растений рода тимьян дубильных веществ преимущественно конденсированной группы. Количественное определение проводили двумя методами: перманганатометрическим и комплексометрическим [34, 36]. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9.

Содержание дубильных веществ в растениях рода тимьян [36]

Растение, время и место сбора	Содержание дубильных веществ, %	
	Перманганатометрический метод	Комплексонометрический метод
Тимьян Палласа, Белгородская обл., 2012 г.	14,70±0,59	9,50±0,39
Тимьян меловой, Белгородская обл., 2011 г.	13,70±0,59	7,60±0,28
Тимьян ползучий	16,02±0,72	11,15±0,48
Тимьян блошиный, Брянская обл., 2012 г.	22,68±0,30	9,10±0,10
Тимьян Маршалла, Белгородская обл., 2011 г.	14,00±0,20	8,50±0,02
Тимьян двуликий, Курская обл., 2013 г.	12,04±0,20	6,54±,15
Тимьян Черняева, Курская обл., 2014 г.	12,37±0,22	9,34±0,24

Наряду с этим были определены оптимальные условия экстракции дубильных веществ на одном образце тимьяна Маршалла, как наиболее распространенного в областях Средней полосы европейской части России, в сравнении двумя методами: перманганатометрическим и комплексонометрическим. Результаты представлены в таблице 10 [36].

Таблица 10.

Оптимальные условия для получения максимального выхода дубильных веществ из травы тимьяна Маршалла [36]

№ п/п	Условия экстракции	Комплексонометрический метод	Перманганатометрический метод
1	Степень измельченности, мм	2	
2	Экстрагент	Спирт этиловый 30%	Спирт этиловый 40%
3	Время экстракции, мин	45	
4	Соотношение сырье:экстрагент	2:250	

Выделенные оксикоричные кислоты и их производные идентифицированы по флуоресценции пятен на хроматограммах. Выделенный кумарин идентифицировали по флуоресценции пятна на хроматограмме в УФ-свете, хроматографической подвижности, данным УФ-, ИК-спектров. Кумариновая природа исследуемого соединения подтверждена также деструкцией кислотой йодистоводородной в среде жидкого фенола. Из оксикоричных кислот идентифицированы: кофейная, хлорогеновая, розмариновая кислота, из кумаринов – скополетин [34].

Информации о системных исследованиях по разработке оптимальных условий экстракции и количественного анализа суммы флавоноидов в траве чабреца в литературе недостаточно [37]. Учеными ПМГМУ им. И.М. Сеченова разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве чабреца и лекарственных формах на ее основе (настое и жидком экстракте). Установлены оптимальные условия для извлечения флавоноидов из травы чабреца и кинетические характеристики реакции образования комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом [38]. Сумма флавоноидов в сырье в пересчете на рутин составила 1,36%, в настое – 0,018%, в жидком экстракте – 0,11% [34]. В траве тимьяна мелового их содержание колеблется от 1,12% до 1,43 % [34].

Из индивидуальных флавоноидов выделены: цинарозид, космоссиин, скутеллярин. Данное исследование легло в основу разработки ФС для ГФ XIII, в соответствии с которой стандартизация сырья чабреца и лекарственных форм, полученных на его основе, осуществляется по содержанию флавоноидов.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что тимьян меловой имеет близкий состав фенольных соединений с тимьяном ползучим. Тимьян меловой может представлять интерес в качестве лекарственного сырья [34].

АМИНОКИСЛОТНЫЙ И ПОЛИСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ ТРАВЫ ТИМЬЯНА

В растениях рода тимьян наиболее полно изучено эфирное масло, фенольные и тритерпеновые соединения. Мало исследованы углеводы, и в частности пектиновые вещества [39], обладающие способностью к комплексообразованию, связыванию катионов поливалентных металлов, на чем основано их применение в качестве детоксикантов при отравлении радиоактивными изотопами и солями тяжелых металлов. Выход пектиновых веществ из травы тимьяна Маршалла составляет 17,78%. Количество функциональных групп пектиновых веществ, содержащих свободные карбоксильные группы, составляет 19,76%, метоксилированных карбоксильных групп – 4,76%, общее количество карбоксильных групп – 24,51%, метоксильных групп – 3,27%, степень метоксилированности пектинов – 19,47%. Пектиновые вещества травы тимьяна Маршалла характеризуются невысокой степенью этерификации, на основании чего их можно рекомендовать для использования в фармацевтической технологии в качестве желирующих агентов [3].

При изучении полисахаридного состава травы тимьяна Палласа были выделены полисахариды по фракциям [40]. Исследование моносахаридного состава полисахаридных комплексов проводили методом хроматографии на бумаге после гидролиза 2 М кислотой серной при температуре 100–150 °С в течение 6 ч (для водорастворимого полисахаридного комплекса (ВРПС)), 24 ч (для пектиновых веществ) и 48 ч [для гемицеллюлозы А (Гц А) и гемицеллюлозы Б (Гц Б)]. Разделение и идентификацию нейтральных моносахаридов проводили методом нисходящей хромотографии на бумаге в системе растворителей n-бутанол – пиридин – вода (6:4:3) параллельно со стандартными образцами сахаров. Кислые моносахара разделяли в системе этилацетат – кислота муравьиная – вода – кислота уксусная (18:1:4:3). Проявитель – анилинфталат, температура проявления – 100 °С, длительность проявления – 10–15 мин.

Выход ВРПС составил 4,63%. Выход пектиновых веществ составил 14,01% от массы воздушно-сухого сырья. Выход Гц А составил 0,56%, а Гц Б – 7,15% от массы воздушно-сухого сырья [40].

Методом хроматографии на бумаге параллельно с достоверными образцами сахаров в исследуемом ВРПС идентифицировали глюкозу, галактозу, арабинозу, рамнозу, ксилозу, глюкуроновую и галактуроновые кислоты, с преобладанием ксилозы и арабинозы. В выделенном пектиновом комплексе преобладающей является галактуроновая кислота, кроме того, в нем обнаружены и нейтральные моносахариды: галактоза, арабиноза, глюкоза и рамноза. В гидролизатах Гц А и Гц Б идентифицированы галактоза, арабиноза, глюкоза, ксилоза, рамноза, преобладающей среди них явля-

ется ксилоза, что указывает на наличие полисахаридов типа ксиланов. Денситометрически в гидролизатах выделенных полисахаридных комплексов было установлено количественное содержание моносахаров [40]. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11.

Содержание моносахаридов в полисахаридных комплексах травы тимьяна Палласа, % [40]

№ п/п	Наименование моносахаридов	Полисахаридные комплексы			
		ВРПС	ПВ	Гц А	Гц Б
1	Арабиноза	8,62±1,28	2,10±3,33	1,40±5,00	1,70±4,71
2	Галактоза	4,09±2,45	1,60±5,00	2,70±4,07	2,30±3,91
3	Глюкоза	5,20±2,12	1,40±5,00	2,30±4,78	2,90±3,10
4	Ксилоза	12,10±0,91	–	8,30±1,08	7,90±1,14
5	Рамноза	0,10±3,93	0,10±3,93	0,10±3,93	0,10±3,93
6	Галактуроновая кислота	2,40±3,75	91,31±3,87	–	–
7	Глюкуроновая кислота	1,60±4,38	–	–	–

Учеными КГМУ (В.Н. Бубенчикова и др.) было проведено изучение аминокислотного, жирнокислотного и полисахаридного состава травы тимьяна Палласа, произрастающего на территории Воронежской области. Аминокислотный состав травы тимьяна Палласа представлен 16 соединениями. Содержание свободных аминокислот составляет 0,95 мг / 100 мг, среди них наибольшее содержание отмечено у цистина (0,21 мг / 100 мг) и аланина (0,13 мг / 100 мг). Содержание связанных аминокислот составляет 8,56 мг / 100 мг, среди которых преобладают аланин (1,12 мг / 100 мг), цистин (1,12 мг / 100 мг) и лейцин (1,11 мг / 100 мг) [40]. Результаты представлены в таблице 12 [40].

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ТИМЬЯНА ПАЛЛАСА И ТИМЬЯНА МАРШАЛЛА

Результаты изучения жирнокислотного состава травы тимьяна Палласа методом газожидкостной хроматографии показали наличие 15 жирных кислот, а в сырье тимьяна Маршалла – 16 соединений [41]. Среди них в траве тимьяна Палласа в большом количестве встречается насыщенная жирная кислота пальмитиновая (769,1 мг/кг), а также линолевая (282,1 мг/кг) и линоленовая кислоты (519,5 мг/кг), а в траве тимьяна Маршалла в большом количестве содержится пальмитиновая кислота (1448,50 мг/кг), линолевая кислота (434,15 мг/кг), левулиновая кислота (3543,81 мг/кг) и линоленовая кислота (554,59 мг/кг) (таблица 13) [40, 41].

Таким образом, возможными маркерными жирными кислотами в составе липидов травы тимьяна Паласса являются: 11-октадеценовая, хенейкозеновая и гексадекадионова кислоты, а в траве тимьяна Маршалла – капроновая, левулиновая, лауриновая и α-фурановая кислоты.

Таблица 12.

Содержание и состав свободных и связанных аминокислот травы тимьяна Палласа, (мг / 100 мг воздушно сухого сырья) [40]

№ п/п	Наименование аминокислот	Содержание свободных аминокислот	Содержание связанных аминокислот
1	Аспарагиновая кислота	0,03	0,32
2	Треонин	0,02	0,21
3	Серин	0,03	0,15
4	Цистин	0,21	1,12
5	Глицин	0,04	0,47
6	Аланин	0,13	1,12
7	Валин	0,04	0,28
8	Метионин	0,03	0,24
9	Изолейцин	0,06	0,71
10	Лейцин	0,08	1,11
11	Тирозин	0,03	0,37
12	Фенилаланин	0,03	0,42
13	Гистидин	0,04	0,55
14	Лизин	0,09	0,53
15	Аргинин	0,09	0,96
16	Сумма аминокислот	0,95	8,56

ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТ ТРАВЫ ТИМЬЯНА МАРШАЛЛА

Курскими учеными проведено изучение состава карбоновых кислот травы тимьяна Маршалла. Изучение карбоновых кислот проводили методом хромато-масс-спектрометрии с масс-спектрометрическим детектором. Органические кислоты представлены 9 соединениями (таблица 14) [42].

Среди органических кислот в траве тимьяна Маршалла преобладает лимонная, яблочная, малоновая и щавелевая кислоты. Данные по составу фенолкарбоновых кислот представлены в таблице 15.

Таблица 13.

Жирнокислотный состав липидов травы тимьяна Паласа и тимьяна Маршалла [40]

№ п/п	Наименование кислоты	Содержание жирных кислот, мг/кг	
		Т. Палласа	Т. Маршалла
1	Миристиновая	39,1	123,79
2	Пентадекановая	14,9	13,50
3	Пальмитиновая	769,1	1488,50
4	Пальмитолеиновая	54,2	64,35
5	Гептадекановая	16,5	31,62
6	Стеариновая	5,8	132,53
7	Олеиновая	132,0	252,37
8	11-октадеценовая	19,1	–
9	Линолевая	282,1	434,15
10	Линоленовая	519,5	554,59
11	Арахиновая	51,7	138,56
12	Хенейкозеновая	6,2	–
13	Бегеновая	62,4	167,34
14	Гексадекадионова	46,5	–
15	Тетракозановая	20,3	177,20
16	Капроновая	–	28,09
17	Левулиновая	–	3543,81
18	Лауриновая	–	48,42
19	α-фурановая	–	30,74

Таблица 14.

Состав органических кислот травы тимьяна Маршалла [42]

№ п/п	Наименование органических кислот	Содержание органических кислот, мг/кг
1	Щавелевая кислота	881,35
2	Малоновая кислота	1603,21
3	Фумаровая кислота	26,93
4	Янтарная кислота	379,10
5	Бензойная кислота	59,50
6	Яблочная кислота	979,10
7	Азелаиновая кислота	378,13
8	Лимонная кислота	1885,16
9	Гексадикарбоновая кислота	89,79

Таблица 15.

Фенолкарбоновые кислоты травы тимьяна Маршалла [42]

№ п/п	Наименование фенолкарбоновых кислот	Содержание фенолкарбоновых кислот, мг/кг
1	Ванилиновая кислота	173,20
2	Сиреневая кислота	134,63
3	Гентизиновая кислота	97,17
4	Феруловая кислота	303,10
5	n-оксибензойная	43,20
6	Фенилуксусная кислота	21,50
7	Салициловая кислота	194,63
8	n-кумаровая	40,15
9	4-гидрокси-3-метокси бензойная	32,35

Наибольшее содержание выявлено в траве тимьяна Маршалла для феруловой, салициловой и ванилиновой кислот.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ТИМЬЯНА В МЕДИЦИНЕ

Тимьян издавна использовали для лечения верхних дыхательных путей. Еще в 1887 г. был доказан бактерицидный эффект тимьянового масла против бациллы сибирской язвы, в 1889 г. – против тифа, в 1921–1922 г. – против менингококка, дифтерийной палочки, туберкулезной палочки, стафилококка. Во время I Мировой войны в госпиталях масло тимьяна применяли для заживления ран и дезинфекции инструментов [48].

Главными действующими веществами тимьяна являются тимол и карвакрол, представляющие собой в химическом отношении производные фенола. В отличие от фенола они обладают более сильным бактерицидным действием в отношении кокковой патогенной флоры, но менее эффективны против грамотрицательных микроорганизмов. Раздражающее действие тимола и карвакрола на слизистые оболочки менее выражено, чем у фенола [47].

Препараты травы тимьяна обладают также противовоспалительными, отхаркивающими, спазмолитическими и болеутоляющими свойствами. Они способны купировать эффект снотворных средств, то есть оказывать возбуждающее действие на организм. В отношении спиртовой и эфирной вытяжки из травы тимьяна экспериментально установлен гипотензивный эффект. Действующие вещества травы тимьяна высокоактивны против грибов, ленточных глистов и власоглава [33].

При наружном использовании вытяжки из травы тимьяна оказывают отвлекающее, дезинфицирующее, ранозаживляющее и противовоспалительное действие, улучшают тонус кровеносных сосудов кожи.

Наиболее часто препараты травы чабреца используются при болезнях дыхательной системы: остром и хроническом бронхите, коклюше, воспалении легких, бронхиальной астме. В этих случаях вытяжка чабреца действует главным образом как отхаркивающее, бактерицидное, противовоспалительное и спазмолитическое средство [48]. Два последних свойства позволяют использовать траву чабреца также и при желудочно-кишечных заболеваниях. Имеются, кроме того, экспериментальные данные, свидетельствующие о ее противоязвенной активности. Однако на практике препараты чабреца в качестве желудочного средства широкого применения не нашли. Более того, некоторые специалисты подходят к такому назначению более категорично, считая, что при желудочно-кишечной патология они противопоказаны по причине раздражающего действия тимола. Однако это же свойство позволяет использовать экстракт чабреца в качестве горечи, способствующей повышению секреторной активности пищеварительных желез и, следовательно, аппетита [49].

Учеными Горисского государственного университета были установлены и экспериментально доказаны антиоксидантные свойства травы тимьяна ползучего на модельной реакции инициированного азо-ди-изобуторинитрилом окисления кумола в интервале температур 333–348 К [43].

В ряде исследований проведена оценка антибактериальной активности эфирного масла чабреца и его соединений тимола и карвакрола. Исследуемые компоненты проявили выраженную активность по отношению к широкому спектру микроорганизмов – грамотрицательных (*Escherichia coli, Yersinia enterocolrtica, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella choleraesuis, Salmonella typhimurium, Shigella dysenteria*) и грамположительных (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus cereus, Enterococcus faecalis*), а также плесеней (*Penicillium islandicum u Aspergillus flavus*, дрожжей *Candida albicans*). Масло тимьяна в концентрациях 38–75 мкг/мл при культивировании в течение 24 часов с бактериями *Trypanosoma cruzi* подавляли рост микрооганизмов и нарушали их ультраструктуру. Показан эфект масла тимьяна и его компонентов и по отношению к *Leishmania (Viannia) panamensis*. Антимикробный эффект эфирного масла растения и его отдельных компонентов связывают с тем, что, обладая липофильными свойствами, они встраиваются в клеточные мембраны бактерий, нарушая их структуру, изменяя проницаемость и состав внутриклеточной среды [44]. Наряду с данными свойствами обнаружено благоприятное влияние тимьяна на эндоэкологическое состояние гастроинтестинальной микрофлоры как следствие контроля роста потенциальных патогенов и стабилизации микробного эубиоза желудочно-кишечного тракта [44, 45].

В настоящее время зарегистрированы на территории Российской Федерации следующие ЛП на основе тимьяна: «Пертуссин», «Алталекс», «Антисептин», «Витаон», «Ментоклар гель», «Ментоклар карманный ингалятор», «Соматон», «Коделак бронхо с чабрецом», «Гербион с первоцветом», «Коделак фито», «Бронхикум С», «Бронхикум ТП», «Туссимаг», «Бронхипрет», «сбор Фитоседан № 3», «Эвкабол», «эликсир Бронховит», «сбор Стопал» [6].

Курскими учеными был изучен и экспериментально доказан также противовоспалительный эффект тимьяна Палласа, произрастающего на территории Воронежской области. Установлено, что противовоспалительное действие настоя тимьяна Палласа проявляется в угнетении стадии экссудации, пролиферации и капилляроукрепляющей активности [49]. По силе фармакологической активности действие настоя тимьяна Палласа превышает действие официнального вида – тимьяна ползучего.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наряду с тимьяном ползучим на территории Европейской части России произрастает около 20 близких видов, которые в природных условиях не различаются заготовителями и используются наравне с тимьяном ползучим, однако химический состав их изучен недостаточно [2]. Известно, что особенности климатических и экологических условий, разнообразие географических зон обуславливают специфику обменных процессов, протекающих в растениях, влияют на синтез и накопление различного спектра БАВ.

Анализ научной литературы показал, что до недавнего времени при изучении химического состава различных видов травы чабреца основное внимание обращалось на определение весьма ограниченного набора биохимических показателей, характеризующего, главным образом, количественное содержание эфирных масел и их компонентный состав, в то время как другие БАВ исследовались недостаточно. С появлением современных физико-химических методов анализа этот пробел значительно восполнен. Однако имеющаяся информация носит фрагментарный характер и, как правило, отражает результаты краткосрочных наблюдений. Кроме того, большинство работ относится к изучению состава БАВ травы чабреца фармакопейных видов. Экспериментальные данные разрознены, относятся к разным географическим областям и получены в разные годы по разным методикам анализа, что затрудняет сравнение количественного содержания определенных соединений [20].

Проведенный анализ в целом показал значительное сходство в составе БАВ травы тимьяна различных видов, что позволяет использовать в медицине другие виды, произрастающие на различных территориях, а также решить проблему рационального использования природных ресурсов и уйти от необходимости культивирования тимьяна ползучего на территории России. Различные исследования показали, что нефармакопейные виды тимьяна также обла-

дают выраженной противовоспалительной активностью. В то же время эфирное масло травы различных видов тимьяна характеризуется индивидуальным составом компонентов, что наряду с микродиагностическими признаками может быть использовано для целей идентификации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.А. Дурнова, А.Н. Романтеева, А.Н. Ковтун. Химический состав эфирного масла тимьяна Маршалла и тимьяна Палласа, произрастающих на территории Саратовской области // Химия растительного сырья. 2014. № 2. С. 115–119.
2. В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак. Исследование эфирного масла тимьяна блошиного // Фармацевтические науки. 2014. № 8. С. 116–118.
3. В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак, Е.С. Лапина. Тимьян Маршалла – источник пектиновых веществ // Фармацевтические науки. 2015. № 1. С. 1139–1141.
4. Т.А. Ильина. Лекарственные растения России. – М.: Эксмо, 2006. 192.
5. В.Н. Кортиков, А.В. Кортиков. Справочник лекарственных растений. – Ростов-на-Дону.: Проф-Пресс, 2002. 800 с.
6. Н.Н. Чаадаева, О.А. Бойцова. Анатомические особенности строения *Thymus serpyllum* L., произрастающего на территории Орловской области // Ученые записки. – С. 134–140.
7. А.Г. Бузук, Р.А. Юрченко, В.А. Винарский, Г.Н. Бузук. Сравнительный фармакогностический анализ травы чабреца // Вестник фармации. 2011. № 3. С. 19–24.
8. П.Ф. Маевский. Флора средней полосы европейской части России. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 600 с.
9. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т.4. Семейства Caprifoliaceae – Lobeliaceae / Под ред. А.Л. Буданцева. – СПб.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. 630 с.
10. И.А. Самылина, О.Г. Аносова.. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие: в 2-х томах. Т. 2. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 384 с.
11. И.А. Самылина, В.А. Ермакова, И.В. Бобкова, О.Г. Аносова. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие в 3-х томах. Т. 3. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 488 с.
12. Е.Г. Худоногова, Т.В. Киселева. Содержание эфирных масел в надземной части тимьяна ползучего // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2010. № 7. С. 110–113.
13. Т.Н. Пересыпкина, С.В. Сур. Состав эфирных масел травы чабреца // Химико-фармацевтический журнал. 1988. № 11. С. 1361–1365.
14. Д.А. Коновалов, В.Н. Оробинская, О.Н. Писаренко. Антиоксиданты плодов и овощей // Современная наука и инновации. 2013. № 4. С. 76–82.
15. В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак. Исследование эфирного масла тимьяна двуликого // Фармация. №5. 2015. С. 7–9.
16. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР, 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. 400 с.
17. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.: в 3 т. – М.: МЗ РФ, 2015. URL: http://www.femb.ru/feml (дата обращения 31.10.2016).
18. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 3 т. Т. 2 / УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: Типография Победа, 2008. 472 с.
19. European Pharmacopoeia: Supplement, 2008. 6rd ed., – Strasbourg: Council of Europe, 2008. 3905 p.
20. Ю.А. Банаева, Л.М. Покровский, А.В. Ткачев. Исследование химического состава эфирного масла представителей рода Thymus L., произрастающих на Алтае // Химия растительного сырья. 1999. № 3. С. 41–48.
21. А.Н. Рабжаева, И.В. Звонцов, Л.Д. Раднаева. Химический состав эфирного масла тимьяна Байкальского Thimus baikalensis Serg., произрастающего в Забайкалье // Химия растительного сырья. 2008. № 1. С. 73–76.
22. P. Martonfi, A. Greijtovsky, M. Repcak. Chemotype pattern differentiation of Thymus pulegioides on different substrates // Biochem. Syst. Ecol. 1994. V. 22. P. 819–825.
23. Z. Kisgyorgy, K. Csedo, H. Horster et set. The volatile oil of the more important indigenous Thymus species occurring in the composition of Serpylli herba // Rev. Med. (Tirgu-Mures, Rom.). 1983. P. 124–130.
24. D. Kustrak, Z. Martinis, J. Kuftinec, N. Blazevic. Composition of the essential oils of some Thymus and Thymbra species // Flavour Fragr. J. 1990. V. 5. P. 227–231.
25. В.Г. Киселева, Ю. А. Смирнова. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества. – М.: Издательство профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. 295 с.

26. Д. Моцкуте, Г. Бернотене. Эфирное масло Thymus pulegioides L. с лимонным запахом из окрестностей Вильнюса // Растительные ресурсы. 1998. № 1, Т. 34. С. 131–134.

27. E.M. Suleimenov, S. Machmudah, M.Yu. Ishmuratova et set. Investigation of Kazakhstani flora. I. GC MS analysis of Thymus marschallianus Willd essential oil obtained by supercritical CO2 extraction // Химия растительного сырья. 2010. № 1. С. 161–163.

28. Л.А. Фуклева, Л.А. Пучкан. Изучение состава и возможность использования чабреца обыкновенного и крымского в фармацевтической практике // Научные ведомости. 2013. № 18. С. 207–210.

29. А.Н. Рабжаева, С.В. Жигжитжапова, Л.Д. Раднаева. Компонентный состав эфирного масла Thymus baicalensis Serg. (семейство Lamiaceae), произрастающего на территории восточной сибири и Монголии // Химия растительного сырья. 2015. № 2. С. 119–126.

30. Ю.В. Левачкова. Актуальность эфирных масел для лечения воспалительных заболеваний в гинекологии // Материалы юбилейной науч.- практ. Конференции «Фармакогнозия XXI столетия», 26 марта 2009 г. Киев. 136 с.

31. З.А. Назарова. Современное состояние и перспективы развития мягких лекарственных средств для местного применения // Фармацевтический журнал. 2007. № 4. С. 78–81.

32. А. Стоянова, А. Георгиева, Е. Георгиев. Содержание эфирного масла в сырье чабреца горного и тимьяна ползучего // Известия вузов. Пищевая технология. 2000. № 5. С. 15–16.

33. Д.Д. Таран, Г.И. Калинкина. Химический состав и фармакологические свойства эфирного масла Thymus serpyllum L., выращиваемого в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН // Растит. ресурсы. 1994. Вып. 3. С. 66–70.

34. В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак. Изучение фенольных соединений тимьяна мелового // Научные ведомости. – 2011. № 22. С. 203–205.

35. Химический анализ лекарственных растений / Под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. – М.: Высшая школа, 1984. 176 с.

36. В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак. Изучение дубильных веществ растений рода тимьян флоры средней полосы Европейской части России // Научные ведомости. 2015. № 16. С. 174–179.

37. Н.А. Зыкова. Совершенствование существующего и разработка нового экстракционного препарата травы чабреца: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Пятигорск, 1990. 22

38. А.И. Марахова, Н.Н. Федоровский, А.А. Сорокина, М.Н. Галько. Определение флавоноидов в траве и лекарственных формах тимьяна ползучего // Фармация. 2013. №5. С. 14–17.

39. А.А. Злобин, Е.А. Мартинсон, Ю.С. Оводов. Антиоксидантная и антимикробная активность пектинов ряда растений Европейского севера России // Известия Коми НЦ УрО РАН. 2011. № 7. С. 33–37.

40. В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак. Аминокислотный, жирнокислотный, полисахаридный состав травы тимьяна Палласа // Химия растительного сырья. 2014. № 3. С 191–194.

41. A.I. Carrapiso, C. Carcia. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification // Lipids. 2000. № 35. P. 1167–1177.

42. В.Н. Бубенчикава, Ю.А. Старчак, А.А. Безъязычная. Карбоновые кислоты травы тимьяна Маршалла // Фундаментальные исследования. 2015. № 2. С. 3316–3318.

43. Л.Р. Варданян, С.А. Айрапетян, А.Э. Аветисян. Антиоксидантное действие эфирного масла тимьяна ползучего // Химия растительного сырья. 2013. № 3. С. 143–148.

44. С.Н. Удинцев, Т.П. Жилякова, Д.П. Мельников. Перспективы применения травы и шрота чабреца // Свиноводство. 2010. № 5. С. 18–1.

45. Л.В. Ковалева, С.В. Райкова. Изучение антимикробной активности действия эфирных масел тимьяна Маршалла и тимьяна Палласа // Материалы 72-й межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. Саратов, 2011. С. 488–489.

46. Э.Э. Локшина, О.В. Зай- цева, Г. Б. Кузнецов. Клинический опыт применения препарата Коделак фито у детей с острыми респираторными инфекциями // Педиатрия. 2009. Т. 87, № 2. С. 96–100.

47. С.П. Корсакова, В.Д. Работягов, Б.А. Виноградов. Модель эколого-генетического контроля биосинтеза тимола в эфирном масле Thymus L. // Черноморский ботанический журнал. 2006. Т. 2. № 1. С. 50.

48. Д.Б. Утешев, А.А. Карабиненко, И.Н. Челенкова, И.Н. Денисов. Применение комбинированных препаратов для лечения кашля в терапии острого бронхита // РМЖ Пульмонология. 2010. №5. Т. 18. С. 270–272.

49. В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак. Противовоспалительная активность травы тимьяна Палласа // Кубанский научный медицинский вестник. 2015. №5. С. 25–28.

КОМПЛЕКСНОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ ЛАБОРАТОРИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ

Досье на серию РФП - это ключевой документ, подтверждающий качество произведенного препарата. В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIII для подтверждения качества РФП необходимо проводить такие виды анализов, как высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, тонкослойная хроматография, гамма-спектрометрия, осмометрия, определение наличия бактериальных эндотоксинов, определение pH, объемной активности РФП с определением периода полураспада меточного радионуклида. Для указанных видов анализов в портфеле ГК «Фармконтракт» представлено соответствующее оборудование известных мировых производителей

ВЭЖХ-хроматограф Agilent Technologies
Определение радиохимической чистоты РФП, качественного и количественного наличия примесей

Газовый хроматограф Agilent Technologies
Определение содержания остаточных растворителей в РФП

pH-метр METTLER TOLEDO
Высокая точность определения кислотно-щелочного баланса анализируемого РФП

TLC-сканер RAYTEST
Проведение количественного и качественного анализа РФП

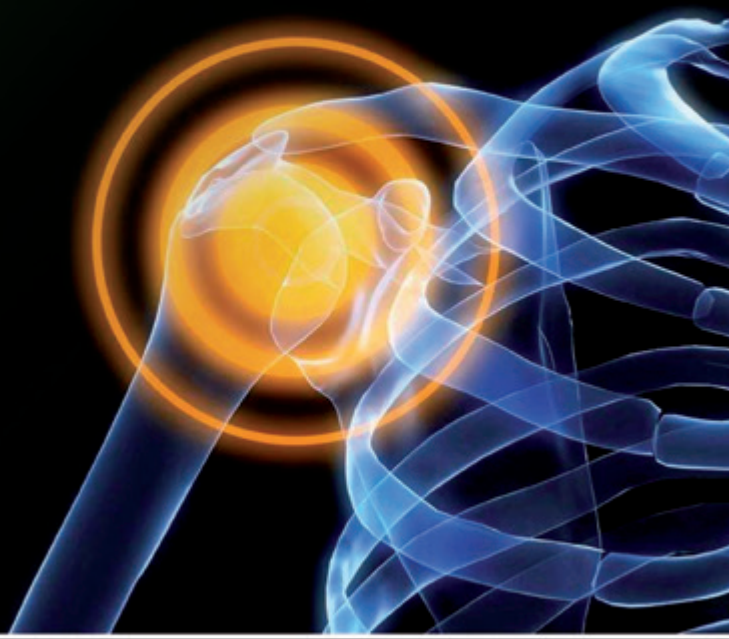
Гамма-спектрометр RAYTEST
Определение спектра радиоактивного излучения РФП

Radio-HPLC детектор RAYTEST
γ-детектирование при проведении ВЭЖХ

РЕЗУЛЬТАТЫ КАЖДОГО АНАЛИЗА – ЗАЛОГ УСПЕШНОГО ФОРМИРОВАНИЯ ДОСЬЕ НА СЕРИЮ РФП!

ГК «Фармконтракт» предлагает комплексные решения для лабораторий контроля качества РФП на основе оборудования ведущих мировых производителей, обеспечивающего оперативность и точность получения результатов с соблюдением требований защиты производственного персонала от ионизирующего излучения РФП

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЕ ЗАЩИТНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ COMECER



Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com

УДК 615.07,
615.074,
615.22

ИЗУЧЕНИЕ СРАВНИТЕЛЬНОЙ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ВАЛСАРТАН II КЛАССА БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ В СООТВЕТСТВИИ С ПРОЦЕДУРОЙ «БИОВЕЙВЕР»

Е.Р. Бригас[1]*, Е.В. Успенская[2], В.В. Писарев[3]

1 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины, 119192, Россия, г. Москва, Ломоносовский проспект, 31, к. 5

2 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», кафедра фармацевтической и токсикологической химии, 117556, Россия, г. Москва, Миклухо-Маклая ул., 8

3 – Научно-производственный центр «Пробиотек», 111024, Россия, г. Москва, ул. 5-я Кабельная, 2Б, стр. 1

1 – M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, 31/5, Lomonosovskii pr., Moscow, 119192, Russia

2 – People Friendship University of Russia, 8, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117556, Russia

3 – Scientific-production center "Probiotech", 2B/1, 5-ya Kabelnaya str., Moscow, 111024, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail:
katekukushkina28@gmail.com

Резюме. Проведено сравнительное исследование кинетики растворения лекарственных препаратов валсартана в трех средах растворения, моделирующих основные разделы ЖКТ, с последующим количественным определением методом УФ-спектрофотометрии при длине волны 254 нм. Исследование проводили на аппарате «Лопастная мешалка», точки отбора соответствовали 5, 10, 15, 30 минутам. Полученные значения факторов подобия f2 подтвердили эквивалентность кинетики растворения и составляют: f2=67 в растворе хлористоводородной кислоты с pH 1,2, f2=57 в фосфатном буферном растворе с pH 4,5. В фосфатном буферном растворе с pH 6,8 через 15 минут в раствор перешло более 85% действующего вещества, поэтому профили эквивалентны без математической оценки.

Ключевые слова: сравнительный тест кинетики растворения, биовейвер, валсартан.

DISSOLUTION PROFILE STUDIES OF BCS CLASS II DRUG VALSARTAN BY BIOWAIVER PROCEDURE

E.R. Brigas[1]*, E.V. Uspenskaya[2], V.V. Pisarev[3]

Abstract. Drug release studies (or *in vitro* release) of valsartan in three dissolution media simulating the main sections of the gastrointestinal tract were conducted. The concentrations were determined using UV/Vis spectrophotometer (Varian Cary 50) at 254 nm. The study was conducted using dissolution apparatus with the paddle assemble; 5-mL sample aliquots were withdrawn at 5, 10, 15, and 30 min. Estimation f2 parameter confirmed the equivalence of valsartan dissolution kinetics: f2=67 in hydrochloric acid solution, pH 1,2; f2=57 in phosphate buffer, pH 4,5, and in phosphate buffer, pH 6,8 – dissolution amount is greater than 85% at 15 min, so the two products are deemed equivalent, and a profile comparison is not necessary.

Keywords: comparative dissolution profile, biowaiver, valsartan.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из задач стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года является совершенствование системы подтверждения соответствия качества лекарственных средств. Основным мероприятием для достижения поставленной цели является стимулирование разработки и производства аналогов импортируемых воспроизведенных и инновационных лекарственных средств [1, 2].

Немаловажной задачей остается оценка их биоэквивалентности, поскольку главной целью стратегии развития фармацевтической промышленности России является создание устойчивой национальной индустрии, способной обеспечить население Российской Федерации доступными, эффективными и безопасными лекарствами в необходимых количествах [1].

На сегодняшний день, согласно рекомендациям ВОЗ, существует 4 способа подтверждения эквивалентности воспроизведенных лекарственных средств оригинальным препаратам. Это сравнительные фармакокинетические исследования с участием людей, фармакодинамические исследования с участием людей и сравнительные клинические исследования [3, 4]. Вышеперечисленные исследования являются дорогостоящими и продолжительными. В связи с этим становится актуальным использование четвертого подхода ВОЗ для оценки эквивалентности ЛС – сравнительных исследований *in vitro* по процедуре «биовейер» [3, 4].

Сравнительный тест кинетики растворения (СТКР) применяется на различных этапах жизненного цикла ЛС, а именно: на стадиях разработки, при регистрации дополнительных дозировок, при изменении

технологии производства, при посерийном контроле качества и при государственной регистрации воспроизведенного препарата [5]. Согласно руководству FDA установленная корреляция *in vitro – in vivo* (IVIVC) класса А может заменить или сократить количество сравнительных фармакокинетических исследований на этапе разработки ЛС, а также пострегистрационных изменений, но не может заменить регистрационное исследование биоэквивалентности [6]. В случае использования СТКР как замены фармакокинетических исследований следует учитывать такой параметр, как корреляция *in vitro – in vivo*, способный прогнозировать биодоступность *in vivo* на основании данных *in vitro*. В основном IVIVC возможно установить для ЛП с модифицированным высвобождением и для ЛП с немедленным высвобождением при условии, что ЛС принадлежит ко II классу биофармацевтической классификационной системы. Исследование проводилось с лекарственным препаратом валсартан, применение которого в последнее время значительно возросло [7]. На основании данных ВОЗ проведение процедуры «биовейер» возможно для I, II и III класса по БКС [3]. Процедуру «биовейер» допускают также руководства FDA, EMA, ЕАЭС и др [9, 10, 11]. Все перечисленные нормативные документы имеют ряд сходных положений. Так, руководства FDA и EMA допускают процедуру «биовейвер» для I и III класса БКС [9, 10]. Евразийский экономический союз регламентирует проведение теста сравнительной кинетики растворения в целях биовейвера дозировок для I и III класса БКС [11]. Позиция FIP допускает проведение процедуры «биовейвер» для I, III класса БКС и для трех ЛП, принадлежащих ко II классу БКС: диклофенака калия или натрия, ибупрофена, кетопрофена [12]. Данные АФИ проявляют слабые кислотные свойства, при низких значениях pH характеризуются низкой растворимостью, при pH 6,8 растворимость этих веществ увеличивается. В соответствии с руководством ВОЗ вещества, имеющие высокую растворимость при pH 6,8, быстро переходят в раствор в верхних отделах тонкого кишечника и, следовательно, будут доступны для всасывания. При условии высокой проницаемости низкая растворимость АФИ в кислой среде желудка не должна представлять собой значительного барьера для всасывания [12].

На основании литературных данных исследуемый препарат валсартан относится ко II классу по БКС: имеет высокую проницаемость – коэффициент перераспределения log P 5,8 – и низкую растворимость в воде < 0,1мг/мл [8], тогда как растворимость валсартана в буферном растворе с pH 6,8 высокая и составляет 43,5 мг/мл [13]. Используя отношение высшей разовой дозы (320 мг) к растворимости (43,5 мг/мл) при pH 6,8, можно сделать вывод о высокой биофармацевтической растворимости валсартана: АФИ в высшей разовой дозе растворяется в 250 мл [3, 4, 9]. Следовательно, ЛС валсартан можно отнести ко II классу по БКС.

Таким образом, положительные результаты исследования оценки эквивалентности *in vitro* воспроизведенного ЛС валсартан на основании процедуры «биовейвер» могут иметь прогностическую ценность при выборе серий ЛС для последующего проведения исследования биоэквивалентности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Валсартан [N-(1-оксопентил)-N-((2′-(1H-тетразол-5-ил)(1,1′-бифенил)-4-ил)метил)-L-валин] – антигипертензивное ЛС, блокатор рецепторов ангиотензина II. Белый или почти белый порошок, малорастворим в воде [14, 15].

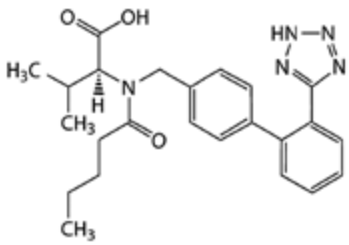


Рисунок 1. Структурная формула валсартана

Исследуемый препарат: таблетки валсартана, покрытые пленочной оболочкой, 40 мг (НПЦ «Пробиотек»); вспомогательные вещества: целлюлоза микрокристаллическая, кросповидон, кремния диоксид коллоидный (аэросил), магния стеарат; состав оболочки: опадрай II, титана диоксид Е171, тальк, макрогол (полиэтиленгликоль-3350), краситель железа оксид желтый Е172, алюминиевый лак; срок годности был действителен.

Препарат сравнения: таблетки валсартана, покрытые пленочной оболочкой, 80 мг (НПЦ «Пробиотек»); вспомогательные вещества: целлюлоза микрокристаллическая, кросповидон, кремния диоксид коллоидный, магния стеарат; состав оболочки: гипромеллоза, титана диоксид, макрогол 8000, краситель железа оксид желтый Е172; срок годности был действителен.

СТКР может выполняться как замена исследований биоэквивалентности для дополнительных дозировок. В случае если регистрации подлежат несколько дозировок, то в зависимости от свойств ЛС достаточно провести исследование биоэквивалентности в отношении одной дозировки. Фармакокинетика валсартана является линейной [11], поэтому ис-

следование биоэквивалентности было проведено для наибольшей дозировки воспроизведенного препарата – 80 мг.

Условия проведения испытаний

Исследования проводили на аппарате «Лопастная мешалка» Guoming RC-6 dissolution tester (Китай). Выбор временных точек был сделан на основании ФСП и базы данных FDA [16]. Точки 15 и 30 минут являются обязательными, последняя точка растворения соответствует полному высвобождению действующего вещества (более 85%) в среде растворения с pH 6,8, которая является наиболее подходящей и рекомендованной USP для таблеток валсартана [17, 18]. Согласно базе данных FDA типичная скорость вращения мешалок для ЛП валсартан с использованием аппарата «Лопастная мешалка» составляет 50 об/мин [6]. В отобранных аликвотах определяли содержание действующего вещества методом УФ-спектрофотометрии. Абсорбцию испытуемого и стандартного растворов измеряли на спектрофотометре Varian Cary 50 (США) при длине волны 254 нм (таблица 1). Среды растворения готовили согласно ГФ РФ XIII [9];

Спектрофотометре Agilent Cary 50

Приготовление сред растворения

Фосфатный буферный раствор с pH 6,8

Раствор калия дигидрофосфата (х.ч.) 27,2 г/л объемом 51,0 мл смешивают с 49,0 мл 71,6 г/л раствора динатрия гидрофосфата (ч.д.а.). При необходимости доводят pH до 6,8 исходным раствором калия дигидрофосфата или динатрия гидрофосфата потенциометрически [19].

0,05 М фосфатный буферный раствор с pH 4,5

6,80 г калия дигидрофосфата (х.ч.) растворяют в 1000,0 мл воды дистиллированной [19].

0,1 М раствор хлористоводородной кислоты

100,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводят водой дистиллированной до объема 1000,0 мл. 1 М раствор хлористоводородной кислоты: 87,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной (х.ч.) доводят водой до объема 1000,0 мл [19].

В стакан для растворения помещали по одной таблетке и проводили растворение. Через указанные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 5 мл механическим дозатором Sartorius Biohit Proline (Финляндия) и фильтровали через мембранный фильтр (GS-Tek SN02545 Nylon, США) с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первую порцию фильтрата. Исследование проводили на станции с ручным отбором проб. Чтобы не создавать дополнительную вариабельность результатов, изменения объема среды учитывали при расчетах. Для каждого выбранного промежутка времени процент высвободившегося ЛС пересчитывали на уменьшение объема среды, таким образом, формула расчета отличалась для каждой из временных точек отбора (формулы 1, 2).

Таблица 1.

Условия СТКР ЛП валсартан

Среда растворения:	1. 0,1 моль/л раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2 [19]; 2. Фосфатный буферный раствор с pH 4,5 [19]; 3. Фосфатный буферный раствор с pH 6,8 [19];
Объем среды растворения	1000 мл;
Скорость вращения	50 об/мин;
Точки отбора проб	5, 10, 15, 30 минут;
Метод количественного определения	УФ-спектрофотометрия;

Формула для расчёта содержания высвободившегося валсартана:

дозировка 40 мг

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P(100 - W) \cdot V_n \cdot 10 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 40 \cdot 2}, \quad (1)$$

дозировка 80 мг

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P(100 - W) \cdot V_n \cdot 10 \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 80 \cdot 2}, \quad (2)$$

где A_0 и A – абсорбция раствора стандартного образца (СО) валсартана и испытуемого образца; a_0 – навеска СО валсартана, мг; P – содержание АФИ в СО, %; W – содержание воды в СО, %; V_n – объем среды растворения с учетом отбора проб, мл.

Приготовление испытуемых и стандартных растворов

Испытуемый раствор для дозировки 40 мг

2,0 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора средой растворения до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор для дозировки 80 мг

1,0 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора средой растворения до метки и перемешивают.

Базовый раствор СО валсартана

Около 10,0 мг (с точностью 0,00005 г) СО валсартана (USP RS) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта 96%, доводят объем раствора спиртом 96% до метки и перемешивают.

Раствор СО валсартана

1,0 мл базового раствора СО валсартана помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора средой растворения до метки и перемешивают.

Для всех данных применена описательная статистика: рассчитаны среднее арифметическое, стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение результатов анализа.

Выполнены требования по вариации данных 12 испытуемых единиц за один временной интервал отбора пробы.

Статистическую обработку проводили с помощью программы MS Excel. Рассчитанное относительное стандартное отклонение (RSD) должно быть не более 20% для первой точки отбора и не более 10% для последующих точек отбора [20].

Для сравнения профилей растворения рассчитывали коэффициент подобия f2 по формуле [20]:

$$f_2 = 50 \cdot \log\left\{\left[1 + (1/n)\sum_{i=1}^{n} |R_i - T_i|^2\right]^{-0,5} \cdot 100\right\}, \quad (3)$$

где n – число временных точек; R_i – содержание лекарственного вещества в растворе, перешедшего в раствор из препарата сравнения в i-й временной точке (в среднем, %); T_i – содержание АФИ в растворе, перешедших в раствор из таблетки в i-й временной точке (в среднем, %).

Значения f2, принадлежащие интервалу от 50 до 100, свидетельствуют об эквивалентной кинетике растворения ЛП.

В случае, когда через 15 минут в раствор переходит более 85% действующего вещества, профили высвобождения считаются эквивалентными и коэффициент подобия f2 не рассчитывают [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Усредненные значения содержания валсартана, высвободившегося в раствор из лекарственных препаратов в разных средах, приведены на рисунке 2 и в таблице 2.

На рисунке 2 видно, что только профиль растворения в среде с pH 6,8 выходит на плато со значением высвобождения, превышающим 85%, то есть в этих условиях достигается полное высвобождение АФИ. Это свидетельствует о влиянии среды растворения на профиль высвобождения при pH 1,2 и 4,5.

Валсартан в своей химической структуре содержит два кислотных центра с pKa=3,9 и pKa=4,73 [22]. Нами было отмечено, что за счет проявления кислотных свойств валсартан имеет низкую растворимость в 0,1 моль/л растворе хлористоводородной кислоты с pH 1,2, высвобождение действующего вещества в этой среде низкое. В диапазоне pH от 4 до 6 преобладает анионная форма валсартана, в результате увеличивается его растворимость, поэтому в фосфатном буферном растворе с pH 4,5 количество действующего вещества, перешедшего в раствор, заметно увеличивается (рисунок 2) [23]. Время исследования было ограничено 30 минутами согласно требованиям ФСП на ЛП валсартан.

В таблице 2 представлены усредненные значения высвобождения валсартана в раствор из лекарственного препарата.

Как видно из таблицы 2, рассчитанные факторы подобия свидетельствуют об эквивалентности профилей растворения лекарственных препаратов валсартана, так как укладываются в интервал от 50 до 100. В среде с pH 6,8 в раствор переходит более 85% действующего вещества через 15 минут, следовательно, профили эквивалентны без математической оценки.

Результаты исследования можно считать достоверными, исходя из величин стандартного отклонения (см. таблицу 2).

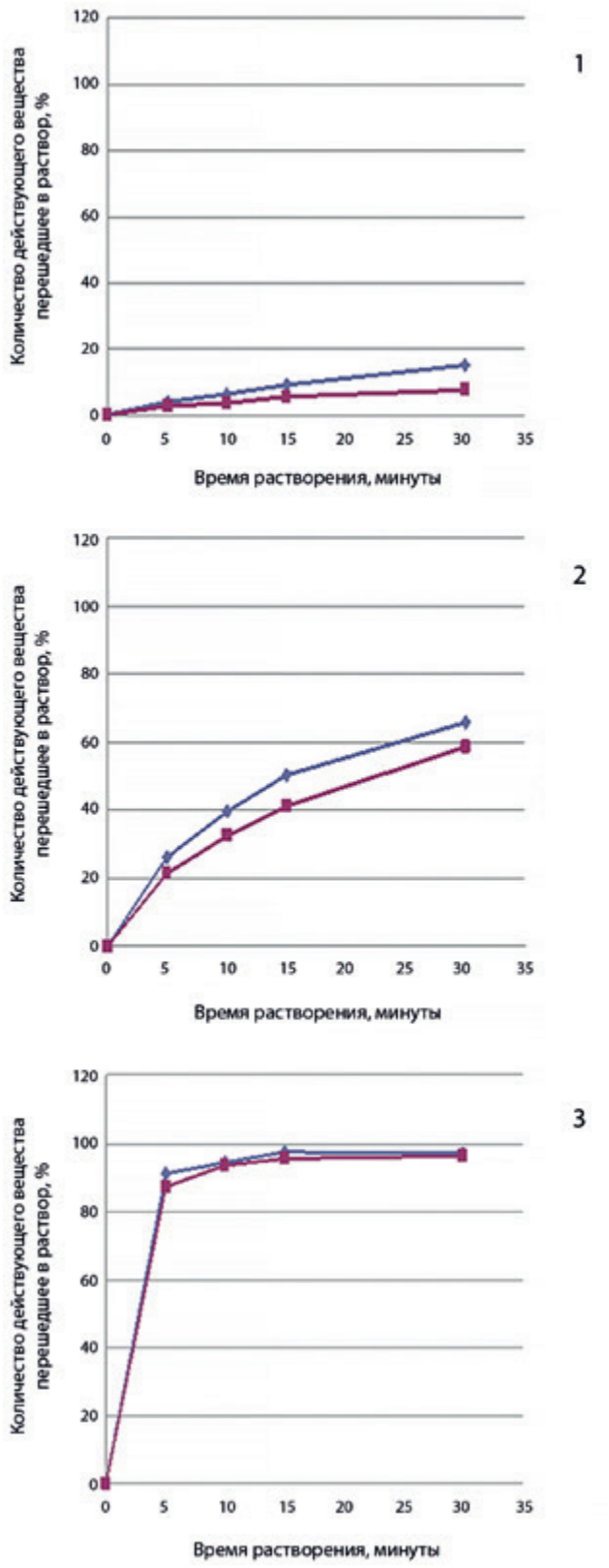


Рисунок 2. **Усредненные профили высвобождения валсартана (n=12) в трех средах растворения: 1 – 0,1 моль/л раствор хлороводородной кислоты с pH 1,2; 2 – фосфатный буферный раствор с pH 4,5; 3 – фосфатный буферный раствор с pH 6,8**

Таблица 2.

Содержание действующего вещества, перешедшего в раствор в разных средах, %

0,1 М раствор хлороводородной кислоты с pH 1,2	Время, минуты							
	Таблетки валсартана, п/п/о, 40 мг Воспроизведенный ЛП				Таблетки валсартана, п/п/о, 80 мг Оригинальный ЛП			
	5	10	15	30	5	10	15	30
Среднее арифметическое	4	7	9	15	3	4	5	7
RSD	15	9	9	9	17	9	8	8
Фактор подобия f_2	**67**							
Фосфатный буферный раствор с pH 4.5	**Время, минуты**							
	Таблетки валсартана, п/п/о, 40 мг Воспроизведенный ЛП				**Таблетки валсартана, п/п/о, 80 мг Оригинальный ЛП**			
	5	**10**	**15**	**30**	**5**	**10**	**15**	**30**
Среднее арифметическое	26	40	50	66	21	32	41	59
RSD	15	8	4	7	9	7	4	2
Фактор подобия f_2	**57**							
Фосфатный буферный раствор с pH 6.8	**Время, минуты**							
	Таблетки валсартана, п/п/о, 40 мг Воспроизведенный ЛП				**Таблетки валсартана, п/п/о, 80 мг Оригинальный ЛП**			
	5	**10**	**15**	**30**	**5**	**10**	**15**	**30**
Среднее арифметическое	91	94	97	97	87	93	95	96
RSD	7	6	3	5	11	7	7	6
Контроль уровня >85%	>85	>85	>85	>85	>85	>85	>85	>85

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказана эквивалентность воспроизведенного и оригинального препаратов валсартана для всех исследуемых дозировок ЛС. Показано, что оптимальной средой растворения препаратов валсартана является фосфатный буферный раствор с pH 6,8, для которого наблюдается наилучшее высвобождение действующего вещества, что подтверждает рекомендации USP о выборе среды растворения для таблеток валсартана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года. Москва, 2009 г.
2. И.Е. Шохин. База данных по растворению FDA – незаменимый инструмент для разработчиков воспроизведенных ЛС (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2012. № 1(1). С. 3–12.
3. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. WHO Technical Report Series 937, 2006, annex 7.
4. И.Е. Смехова, Ю.М. Перова. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 50–61.
5. Д.Ю. Гребёнкин, Я.М. Станишевский, И.Е. Шохин. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворения // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 14.
6. Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence. Studies for Orally Administered Drug. Products – General Considerations. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), March 2003.
7. Н.А. Румянцев, А.С. Румянцев. Динамика потребления антигипертензивных препаратов в 2007–2013 гг. на территории Российской Федерации // Журнал прикладной фармакологии и персонализированной фармакотерапии. 2014. № 3. С. 18–26.
8. S. Beg, S. Swain. Development, Optimization, and Characterization of Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems of Valsartan Using Porous Carriers // AAPS PharmSciTech. 2012. № 13(4): P. 1416–1427.
9. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Biopharmaceutics Revision 1. U.S. Government Printing Office: Washington, DC, May 2015.
10. Guideline on the investigation of bioequivalence, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency, London, 20 January 2010.
11. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза. Версия 2.0 от 20.02.2015.
12. International Pharmaceutical Federation (FIP), Biowaiver Monographs 2004–2012.
13. B.N. Nalluri, M.R. Krishna. Effect of Recrystallization on the Pharmaceutical Properties of Valsartan for Improved Therapeutic Efficacy // Journal of Applied Pharmaceutical Science (JAPS). 2012. № 2(10). P. 126–132.
14. Technical Support Forum // Chemicalize.org. URL: http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=valsartan&source=fp (дата обращения 08.06.2016).
15. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. URL: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2478.htm (дата обращения 29.05.2016).
16. База данных методик теста «Растворение» FDA. URL: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm (дата обращения 10.06.2016).
17. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. Шохина И.Е. – М.: Перо, 2015. 320 с.
18. Official Monographs. Valsartan // First Supplement to USP 35-NF 30.
19. ОФС.1.3.0003.15. // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.
20. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств. Методические указания. Приложение 4. – М.: МЗСР РФ, 2008.
21. General notes on Biopharmaceutics Classification System (BCS)-based biowaiver applications. WHO Prequalification of Medicines Programme. November 2011.
22. G. Flesch, Ph. Muller, P. Lloyd. Absolute bioavailability and pharmacokinetics of valsartan, an angiotenin II receptor antagonist in man // Eur J Clin Pharmcol. 1997. № 52. P. 115–120.
23. N. Siddiqui, A. Husain. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Valsartan: A Review // Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2011. № 1(4); P. 12–19.

УДК 615.074

1 – Институт биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

2 –ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, 20

3 – ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

1 – Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – Center of Pharmaceutical Analytics Ltd, 20, Nauchniy proezd, Moscow, 117246, Russia

3 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: gredmitrij93@gmail.com

РЕТРОСПЕКТИВА РАЗВИТИЯ НАУКИ О РАСТВОРЕНИИ ТВЁРДЫХ ДОЗИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ (ОБЗОР)

Д.Ю. Гребёнкин[1]*, Я.М. Станишевский[1], И.Е. Шохин[2], Е.А. Малашенко[3]

Резюме. Работа освещает основные исторические вехи в развитии науки о растворении лекарственных препаратов и сравнительного теста кинетики растворения от первых экспериментальных работ в области растворения твёрдых веществ в начале двадцатого века, осознания тесной взаимосвязи растворения и биодоступности лекарственных препаратов в 1950-х годах, создания первых аппаратов для растворения до введения процедуры «биовейвер», основанной на БКС.

Ключевые слова: тест кинетики растворения, эквивалентность, дженерики.

RETROSPECTIVE OF DISSOLUTION TEST OF SOLID DOSAGE FORMS (REVIEW)

D.Yu. Grebenkin[1]*, Ya.M. Stanishevskiy[1], I.E. Shohin[2], E.A. Malashenko[3]

Abstract. The article describes the main historical stages in the development of the science of drug dissolution and the dissolution profile test from the theoretical foundations of dissolution, developed in the first half of the 20th century, and the development of a relationship between dissolution and bioavailability in the 1950s, going to the introduction of biowaiver based on the BCS.

Keywords: dissolution profile test, equivalence, generic drugs.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день тест «Растворение» и сравнительный тест кинетики растворения являются важнейшими инструментами в разработке и изучении твёрдых пероральных лекарственных форм, так как биодоступность АФИ во многом зависит от растворения препарата. Трудно представить, но первые предположения о взаимосвязи биодоступности с растворением были сделаны лишь в пятидесятых годах прошлого века, хотя к тому времени растворение твёрдых веществ уже изучалось физической химией более пятидесяти лет. К сожалению, к растворению, как и ко многим другим методам контроля качества лекарственных средств, фармацевтическую индустрию подтолкнули весьма неприятные события на рубеже шестидесятых и семидесятых годов, связанные с клиническим применением препаратов фенитоина и дигоксина. И лишь в 1970 г. первое официальное испытание на растворение появилось в Фармакопее США как необходимый метод контроля качества лекарственных средств. Ещё примерно четверть века потребовалась для того, чтобы растворение стало частью биомедицинских исследований, была разработана биофармацевтическая классификационная система, а затем на её основе возникло новое перспективное направление – «биовейвер».

История изучения растворения твёрдых тел

В 1897 году американские учёные Артур Нойес и Уиллис Уитни опубликовали статью под названием «Скорость растворения твёрдых веществ в растворах этих веществ» («The rate of solution of solid substances in their own solutions», Noyes and Whitney, 1897) [1]. Статья описывала эксперимент, суть которого сводилась к следующему. Труднорастворимое вещество помещалось в постоянный объём растворителя в таком количестве, чтобы на образование насыщенного раствора уходила лишь относительно небольшая его часть, таким образом, площадь поверхности контакта вещества и растворите-

ля оставалась постоянной. Вещество располагалось вокруг цилиндра, который погружался в растворитель и вращался с постоянной скоростью. Температура системы также поддерживалась постоянной. Опыт проводили на двух веществах – бензойной кислоте и хлориде свинца. Авторы заметили, что для обоих веществ справедлива одна и та же закономерность: скорость растворения убывала по мере увеличения концентрации вещества в растворе. Эта закономерность отражена в виде графика на рисунке 1.

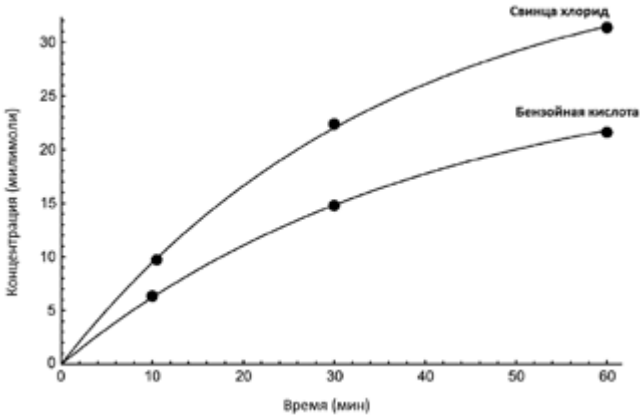


Рисунок 1. Профили растворения свинца хлорида и бензойной кислоты в экспериментах Нойеса и Уитни

Данная зависимость была описана в уравнении:

$$\frac{dC}{dt} = k(Cs - C), \quad (1)$$

где t – время отбора пробы; C – концентрация вещества в момент времени t; Cs – концентрация насыщенного раствора; k – константа.

Описывая механизм процесса растворения, авторы ввели понятие диффузионного слоя скопления молекул, окружающего растворяемое вещество тонкой плёнкой, которую другие молекулы должны преодолеть, чтобы попасть в среду растворения.

Недостатком уравнения Нойеса – Уитни является допущение того, что величина k остается постоянной на протяжении всего времени. Авторами следующей знаковой работы, в которой была предпринята попытка решить эту проблему, стали Эрих Бруннер и Станислас Толлочко из Гёттингена [2]. В 1900 году они опубликовали результаты серии своих экспериментов, в которых включили в исходный эксперимент Нойеса и Уитни дополнительные влияющие на растворение условия: площадь поверхности взаимодействия и её структуру, скорость перемешивания, температура, положение аппарата в пространстве. В целом нововведение заключалось в разложении исходной константы на два множителя $k=k_1S$, таким образом, в уравнение была введена величина площади поверхности взаимодействия S:

$$\frac{dC}{dt} = k_1S(Cs - C). \quad (2)$$

В дальнейшем тот же Эрих Бруннер совместно с прославившимся своими работами в области электрохимии профессором Уолтером Нернстом разработали новый вид уравнения растворения [2], переработав его в соответствии с теорией диффузионного слоя и вторым законом Фика, в результате чего привели константу растворения из (2) к виду $k_1=D/(Vh)$. Полученное уравнение известно как уравнение Нернста – Бруннера:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh}(Cs - C), \quad (3)$$

где D – коэффициент диффузии; h –толщина диффузионного слоя; V – объём среды растворения.

Теории растворения, существовавшие до 1950 года, можно описать как различные варианты теории диффузионного слоя. К пятидесятым годам прошлого века сформировались две альтернативные теории. Уилдерманом (1909), а затем Ждановским (1946) была разработана модель, в которой лимитирующей стадией растворения являлся транспорт частиц вещества через границу раздела фаз [2]. Данная теория не была развита впоследствии и не получила математического описания кинетики процесса. Авторство второй альтернативной теории принадлежало Дэнквертсу. В 1951 году он предложил следующее описание процесса растворения: постоянно обновляющиеся макроскопические пузырьки растворителя взаимодействуют с твёрдой поверхностью, поглощая молекулы и переводя их в раствор. Разрабатывались также комбинации этих теорий. Следует также упомянуть работы Левиха 1962 года, в них он дополнительно учитывал влияние на растворение центробежных сил, возникающих при перемешивании [2].

Открытие взаимосвязи растворения и биодоступности

Несмотря на достижения химических наук в области растворения, фармацевтические науки не осваивали данное направление до пятидесятых годов прошлого века. В те времена биодоступность пероральных лекарственных препаратов связывали исключительно с распадаемостью, а не с растворимостью. Было принято считать, что организм не способен абсорбиро-

вать препарат, пока он не разрушится на достаточно малые частицы. К 1950 году статьи на распадаемость таблеток уже были в Британской Фармакопее и Фармакопее США. Только в 1951 году Д. Эдвардс первым высказал мысль о том, что для твёрдых пероральных препаратов, скорость всасывания которых меньше скорости растворения, растворение может являться тем самым процессом, который контролирует поступление активного вещества в организм [3]. В то же время таблеточное производство развивалось в направлении увеличения плотности и жёсткости таблеток для упрощения их хранения и упаковки. Строго говоря, Эдвардс предположил, что растворение конкретно таблетки аспирина в желудке и кишечнике контролирует процесс его поступления в системный кровоток. Первым же, кому удалось убедительно экспериментально продемонстрировать эту закономерность, был Э. Нельсон, который в 1957 году опубликовал работу по изучению взаимосвязи между уровнем содержания в крови и скоростью растворения *in vitro* пероральных солей теофиллина [4]. Тогда стандартного теста на растворение ещё не существовало и в своих экспериментах он использовал систему растворения следующего вида: нераспадающиеся гранулы вещества, укреплённые на стекле таким образом, чтобы только одна часть поверхности контактировала с растворителем, погружались на дно стакана с объёмом среды растворения 600 мл и перемешивались со скоростью 500 оборотов в минуту.

В шестидесятых-семидесятых годах был опубликован ряд исследований, посвящённых изучению влияния растворения на биодоступность. В 1963 и 1964 годах вышли две важные работы в этой области, связанные с применением двух препаратов толбутамида, продаваемых тогда в Канаде. Выводы исследователей сводились к тому, что препараты не давали полного клинического эффекта из-за низкой скорости растворения и плохой распадаемости. Более того, было показано, что небольшие изменения в технологии препарата толбутамида привели к значительному снижению его поступления в кровоток и, следовательно, снижению клинического эффекта [5]. Тогда же, в 1968 году, поступили сообщения об обнаружении значительной разницы в биодоступности препаратов натрия дифенилгидантоина, хлорамфеникола и сульфафуразола от разных производителей [6]. Немного позже, в 1972 году, была обнаружена большая разница (более 20%) в площади под фармакокинетической кривой трёх препаратов ампициллина [7]. Но самыми показательными с точки зрения исторической ретроспективы примерами влияния растворения лекарственного средства на его клинические характеристики можно считать препараты фенитоина (Австралия и Новая Зеландия, 1968 год) и дигоксина (Великобритания, 1971 год).

Первый показательный случай произошёл в Австралии и Новой Зеландии в 1968 году. Массовые отравления фенитоином произошли из-за того, что производитель заменил кальция сульфат на лактозу в составе вспомогательных веществ таблеток фенитоина немедленного высвобождения [8]. Было показано, что высокая гидрофильность лактозы по сравнению с сульфатом кальция способствовала увеличению скорости высвобождения фенитоина и, следовательно, увеличению скорости его поступления в системный кровоток, в результате чего концентрация фенитоина в плазме оказывалась выше его узкого терапевтического диапазона 10–20 мкг/мл. Спустя 10 лет ситуация повторилась, когда из-за изменения состава и физико-химических характеристик капсул фенитоина изменились соответствующие им параметры растворения [9].

Второй случай был связан с препаратами дигоксина. В 1971 году учёные из Великобритании показали, что при приёме пациентами различных препаратов дигоксина одинаковой дозировки концентрация действующего вещества в плазме крови могла различаться более чем в семь раз [10]. Эти данные побудили FDA совместно с Джоном Вагнером подробно исследовать характеристики растворения 44 партий препаратов дигоксина в дозировке 0,25 мг от 32 различных производителей. По итогам работы были обнаружены колоссальные различия в профилях растворения исследуемых препаратов не только различных наименований, но и различных партий. Те же результаты были получены при повторных исследованиях [11]. Был сделан вывод, что именно характеристики растворения стали причиной столь существенной разницы в биодоступности препаратов.

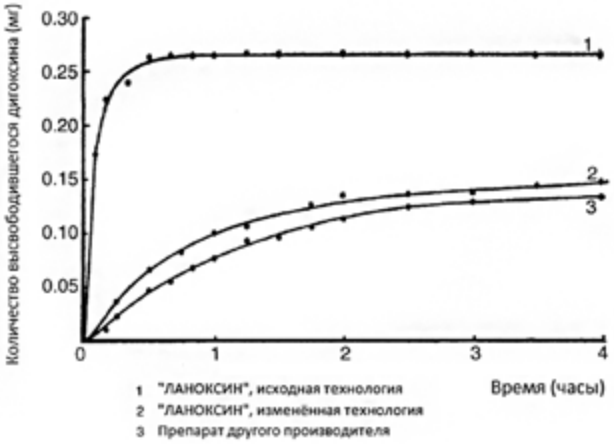


Рисунок 2. Различия в профилях растворения различных препаратов дигоксина [11]

Что касается теста на распадаемость, в период с 1990 по 1995 год в большинстве случаев он был заменён на тест растворения – более объективный и информативный метод анализа.

Создание фармакопейного теста на растворение

Осознание тесной взаимосвязи растворения и биодоступности препаратов в 1960-х годах повлекло за собой введение требований к растворению таблеток и капсул на уровне фармакопей. В то же время характеристики растворения уже были признаны важным показателем качества лекарственных препаратов. Появилась необходимость в разработке стандартного подхода к анализу этих характеристик.

В 1967 году под руководством Рудольфа Блайта была собрана группа экспертов по биодоступности USP-NF, и ею были предприняты первые попытки стандартизации испытания на растворение.

В конце 1968 года разработка теста на растворение была поручена группе исследователей, возглавляемой Уильямом Дж. Мейдером из Лаборатории по стандартизации лекарств (Drug Standards Laboratory, DSL), главой Американской фармацевтической ассоциации (American Pharmacists Association, APhA), экспертом в области аналитики и контроля.

Первым аппаратом для теста растворения, сконструированным под руководством Мейдера, была стеклянная ванна объемом 380 литров, накрытая пластмассовой столешницей с шестью лунками [13]. Этот агрегат стал прототипом современных термостатируемых водяных бань для станций растворения.

Разработка сосудов для растворения являлась отдельной проблемой задачей по причине того, что, с одной стороны, оптимально было делать их универсальными для всех препаратов, а с другой – существовала серьёзная трудность в выборе адекватного объёма среды растворения для каждого препарата из-за кардинальной разницы в дозировках. Особенную проблему в этом плане представляли малорастворимые лекарственные средства. В прежние времена их дозировки были высоки, но с развитием технологий и клинической медицины стали серьёзно снижаться. За последние 35 лет дозировки снизились очень существенно, например антигипертензивный препарат в дозировке 250 мг сегодня можно заменить другим препаратом в дозировке 5 мг. Соответственно, при проведении испытания на растворение, количество активного вещества, которое должно высвободиться в среду растворения, также будет гораздо ниже. Для некоторых препаратов данное явление также стало проблемой с точки зрения чувствительности аналитических методик [12].

Отдельных усилий потребовала разработка формы сосудов для растворения. За основу были взяты разработки канадского учёного М. Пернаровски: сосуды представляли собой трёхгорлые круглодонные колбы, как в органическом синтезе. Позже от этого дизайна отказались как от непрактичного.

За собственно создание аппарата и его серийное производство отвечал Уильям Хенсон [12]. Он предложил множество экспериментальных вариантов аппарата, один из которых представлен на рисунке 3.

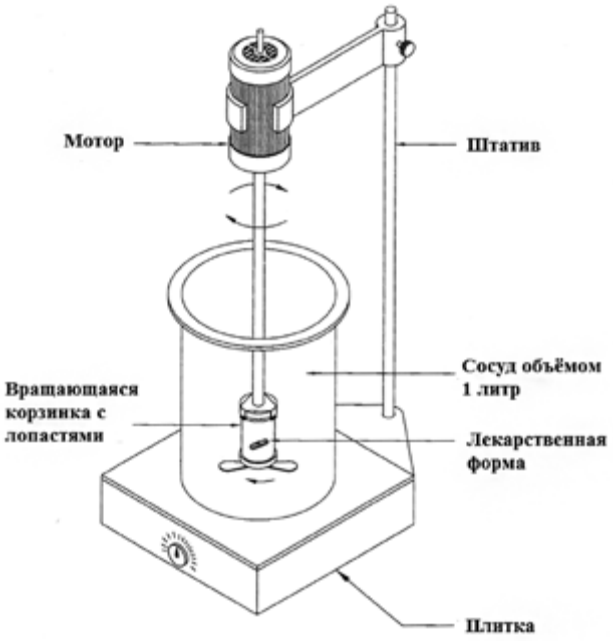


Рисунок 3. Один из ранних экспериментальных вариантов аппарата растворения

Результатом стало появление первого аппарата растворения – «Вращающейся корзинки» (аппарат I согласно USP). В 1970 году этот аппарат появился в шести статьях Фармакопеи США, и их количество неуклонно росло год от года. За нормативные требования, приводимые в статьях, отвечал Уильям Мейдер. Острые дискуссии сотрясали научное сообщество в 1970–80-х годах, так как не было единого мнения о том, как лучше проводить испытания: в то время как статьи USP предписывали измерять время, необходимое для высвобождения определённого количества вещества, статьи NF предлагали более практичный метод измерения количества вещества, высвободившегося за определённое время. Со временем общепринятым стал последний вариант, как значительно более удобный [12].

Уильям Мейдер был весьма опытен в статистической оценке качества аналитического метода. Именно он настоял на том, чтобы не объединять ре-

зультаты растворения большого количества единиц препарата и не проводить тест «Растворение» сразу на нескольких единицах в одном сосуде, а вместо этого анализировать результаты высвобождения АФИ из каждой единицы лекарственной формы отдельно, оценивая отклонения между ними как дополнительный критерий качества. «Пациенты глотают по одной таблетке», – говорил Мейдер. Именно он впервые предложил проводить испытание на шести единицах препарата, так как это оптимально подходило для оценки при помощи параметрического t-критерия Стьюдента. Увеличение количества испытуемых единиц до двенадцати путём проведения дополнительной стадии испытания позволило увеличить доверительный интервал до 95%. Данный подход впервые появился в руководстве 1975 года [13].

Спустя несколько лет, в 1978 году, впервые введён в практику аппарат II – «Лопастная мешалка».

В начале семидесятых годов процесс широкого внедрения испытания на растворение в практику столкнулся с проблемой: существовавшие на тот момент на рынке лекарства производились по отработанной технологии, которая не предполагала ни соответствия нормативам по показателям растворения, ни зачастую наличия таких нормативов. Соответственно, не имели смысла попытки контролировать их качество при помощи испытания на растворение до тех пор, пока не будут разработаны определённые критерии для растворения тех или иных препаратов. Разрабатывать эти критерии предполагалось в связке с некими физиологическими параметрами, поскольку растворение лекарственного препарата чувствительно к физиологическим факторам, таким образом, впервые была поднята тема корреляций *in vivo – in vitro* и физиологической релевантности с точки зрения регуляторных решений. Вскоре в деле разработки критериев растворения появилась определённая ясность, и в 1976 году USP радикально меняет свою политику в отношении испытания на растворение и делает данный раздел обязательным для статей на абсолютно все таблетки и капсулы. В результате уже к июлю 1980 года 76 частных статей Фармакопеи США дополняются разделом, посвящённым методикам испытания на растворение. Большинство этих методик были разработаны в двух лабораториях USP: лаборатории под руководством Ли Грейди и лаборатории под руководством Томаса Лейлофа. В 1985 году статей по растворению было уже 400 [12].

В 1981 году в рамках доклада отдела по надзору за деятельностью лабораторий отдела по надзору за фармацевтической промышленностью Международной фармацевтической федерации (МФФ, International Pharmaceutical Federation, FIP) были опубликованы первые руководства по проведению исследований растворения.

В 1985 году в 21 издании Фармакопеи США выходит статья «*Drug release*» («Высвобождение лекарственных средств»). Тогда же было принято, что оптимальное время проведения стандартного теста на растворение – 45 минут, и за это время должно высвободиться не менее 75% действующего вещества, и что иное должно обсуждаться в отдельном порядке.

В 1991 году для растворения препаратов с модифицированным высвобождениям начинает применяться аппарат III USP «Качающийся цилиндр», а за ним, в 1995 году – аппарат IV USP «Проточная ячейка».

Изучение факторов, влияющих на растворение лекарственных препаратов

Выявление важности параметров растворения лекарственного препарата для его биодоступности в пятидесятых-шестидесятых годах также дало толчок исследованиям факторов, влияющих на растворение.

Одним из самых важных факторов, влияющих на процесс растворения, является скорость перемешивания. Как правило, чем выше скорость перемешивания, тем быстрее идёт растворение. Эта зависимость была изучена количественно, в 1960-х годах вышло несколько публикаций, которые дали экспериментальные подтверждения степенной зависимости между интенсивностью перемешивания и растворением [15]. При определённых условиях эта зависимость почти становилась линейной.

Также в 1960-х годах изучалось влияние на растворение различных солюбилизирующих агентов: поверхностно-активных веществ и комплексообразователей [16, 17]. Появилась технология «твёрдой дисперсии» для труднорастворимых веществ: активное вещество было представлено в диспергированном виде в гидрофильном носителе, в результате чего повышалась его смачиваемость, увеличивалась поверхность контакта с растворителем и скорость растворения [18, 19].

Другой важный фактор, влияющий на растворение, – это площадь поверхности взаимодействия лекарственной формы с растворителем. Этот параметр больше всего зависит от размера частиц лекарственной формы: чем меньше размер – тем больше поверхность взаимодействия. Это особенно важно при высвобождении труднорастворимых субстанций: например, в 1975 году было показано, что изменение размера частиц в препаратах дигоксина от 100 мкм

до 10 мкм повышает его биодоступность на 100% [20]. Тем не менее зависимость скорости растворения от размеров частиц не всегда столь очевидна. В 1974 году проводились исследования, в которых было продемонстрировано, что если препарат гидрофобный, а среда растворения обладает невысокой смачивающей способностью, то уменьшение размера частиц может привести к уменьшению скорости растворения за счёт слипания, всплывания и, как следствие, уменьшения эффективной поверхности взаимодействия частиц с растворителем [2].

Вариабельность данных

В 1970-х годах, когда испытание на растворение только начало внедряться в практику, показатель RSD (относительного стандартного отклонения), характеризующий сходимость, одинаковость высвобождения действующего вещества из отдельных единиц лекарственного препарата, часто находился в пределах 10–20% (сегодня это не более 10%). Такие данные были получены лабораторией FDA Сент-Луиса по результатам исследований 200 препаратов, доступных на рынке в то время [12]. Показатели же препаратов, разработанных уже с применением испытания на растворение, стали значительно лучше.

Другой ключевой проблемой в этой области являлась сходимость результатов, получаемых в разных лабораториях. С этим удалось справиться благодаря введению в обиход стандартных калибраторов и критериев их применения. В 1978 году появился первый фармакопейный performance qualification (PQ) тест, в котором использовались таблетки-калибраторы преднизона (50 мг) и салициловой кислоты (325 мг).

Для каждой партии калибратора устанавливались свои значения критериев приемлемости результатов по результатам анализа, проводимого лабораториями PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, Ассоциация исследователей и производителей фармацевтической продукции США). Этот подход позволил выявлять различные отклонения в действиях оператора, механических показателях работы прибора, например превышение допустимого уровня вибраций, различные неисправности прибора, хотя в то время ещё не касался важных на сегодняшний день тем дегазации среды и контроля температуры. Если по указанию USP вносились какие-то изменения в оборудование, то методика использования калибраторов немедленно адаптировалась к новым условиям. На волне наибольшего интереса к этой теме в период между 1994 и 1999 годами выходит большое количество работ, посвящённых применению калибраторов, дегазации и т.д.

В наши дни общепринятым подходом к получению данных о растворении препарата является проведение анализа на нескольких единицах этого препарата, например в сравнительном тесте кинетики растворения это, как правило, 12 единиц. Но так было не всегда. Первоначально испытание на растворение проводилось с использованием лишь одной единицы лекарственного препарата, но, как было отмечено выше, в те времена величина RSD высвобождения между отдельными единицами достигала 20% и эта цифра соответственно вносила значительное искажение в оценку межлабораторной сходимости результатов. Лишь в 1977 решением USP был введён в практику подход посерийной оценки растворения твёрдого дозированного лекарственного средства на основании исследования нескольких единиц препарата [12].

Кинетика высвобождения лекарственных препаратов

Рост интереса к собственно кинетике растворения связывают с бурным развитием в конце 1970-х годов лекарственных форм с пролонгированным высвобождением, динамика высвобождения АФИ из которых должна быть исследована особенно подробно в каждом временном отрезке. Однако модели, описывающие кинетику растворения, появились намного раньше, например опубликованная в 1961 году работа Хигучи, в которой анализировалась кинетика высвобождения активного ингредиента из мази. Его модель описывалась уравнением:

$$\frac{q(t)}{q_\infty} = K\sqrt{t},$$

в котором $q(t)$ – количество высвободившегося вещества за время t, q_∞ – количество вещества, которое могло бы высвободиться за бесконечное время (предел высвобождения), K – составная константа, характеризующая вязкость среды и другие свойства системы.

Однако данная модель сильно упрощает картину и поэтому может применяться только для первых 60% кривой высвобождения [$(q(t)/q_\infty) \leq 0{,}60$] [21].

В 1969 году была опубликована работа, внёсшая немалый вклад в изучение кинетики растворения [22]. В ней впервые было описано два главных независимых механизма переноса вещества из препарата в раствор: закон Фика и Case-II-транспорт.

В 1985 году вышла работа, в которой было представлено полуэмпирическое уравнение (так называемый степенной закон), описывающее высвобождение препарата из полимерного материала [2].

В 2000-х годах было создано несколько механистических моделей высвобождения, которые были более реалистичны с точки зрения физики, но обладали чрезвычайно сложным математическим описанием [2]. В работах 2003 года было показано, что кинетику высвобождения препарата как в евклидовом, так и во фрактальном пространстве наилучшим образом описывает функция Вейбулла:

$$m = 1 - \exp\left[\frac{-(t-T)^b}{a}\right],$$

где t – время; T – время запаздывания; a – константа величины; b – константа формы.

В дальнейшем эта модель получила своё развитие применительно конкретно к описанию процесса высвобождения активного вещества из лекарственного препарата [2].

Эквивалентность препаратов

В 1970–80-х годах появились проблемы применения тех или иных препаратов в клинической практике, это поспособствовало росту интереса к растворению и биодоступности лекарственных препаратов. Главным стимулом к изучению эквивалентности с позиций биодоступности стал вопрос о взаимозаменяемости генерических препаратов. В 1973 году по инициативе FDA были вынесены на рассмотрение вопросы биодоступности и биоэквивалентности. Главным инициатором был Бернард Кабана, а позже его идеи развил Джером Скелли. Однако тема эквивалентности *in vitro*, несмотря на существовавшие к тому времени значительные научные и законодательные достижения в этой области, затронута не была. В 1975 году в этом ключе также были рассмотрены вопросы взаимосвязи эквивалентности *in vivo* с эквивалентностью *in vitro*, а к 1977 году законодательная база, регулирующая область исследований биоэквивалентности, была готова.

Существует множество возможных причин отсутствия биоэквивалентности препаратов: особенности метаболизма, особенности всасывания, стабильность и другие. Одним из самых важных среди них является растворение. Анализ архивов исследований FDA в 1980-х годах прошлого показал, что именно особенности лекарственной формы, влияющие на параметры растворения (размер частиц, состав вспомогательных веществ, технология и другие), стали причиной 80% случаев отрицательных результатов при изучении биоэквивалентности генерических лекарственных препаратов в тот период [23]. Таким образом, можно сказать, что параметры растворения были главной причиной отсутствия биоэквивалентности.

Поворотным моментом в истории растворения стал 1997 год: вышло первое руководство FDA [24], в котором наряду с общими требованиями к растворению был впервые приведён подход к статистической оценке эквивалентности профилей высвобождения путём расчёта фактора сходимости f_2:

$$f_2 = 50 \cdot \log\left\{\left[1 + (1/n)\cdot\sum_{i=1}^{i=n}(R_i - T_i)^2\right]^{-0,5}\cdot 100\right\},$$

где n – число временных точек; R_i – количество лекарственного вещества, перешедшего в раствор из препарата сравнения в i-й временной точке (в среднем, в процентах); T_i – количество лекарственного вещества, перешедшего в раствор из исследуемого лекарственного средства в i-й временной точке (в среднем, в процентах).

Кинетика растворения ЛС считается эквивалентной, если значение фактора сходимости f_2 находится в интервале от 50 до 100. Данный метод оценки был разработан Муром и Фланнером [14].

- Тогда же, в сентябре 1997 года, было выпущено руководство FDA [25], посвящённое корреляциям *in vivo – in vitro* (далее IVIVC) для лекарственных форм с модифицированным высвобождением, в котором были изложены основные требования к разработке, расчётам и применению IVIVC. В этом руководстве было описано три уровня корреляции:
- первый уровень – не существует данных, связывающих растворение препарата *in vitro* и биодоступность *in vivo*;
- второй уровень – установлена взаимосвязь между растворением *in vitro* и биоэквивалентностью препаратов *in vivo*;
- третий уровень – тесная корреляция *in vivo – in vitro*.

В этом же руководстве описаны критерии применимости IVIVC для прогнозирования C_{max} и площади под кривой AUC. Данное руководство стало важной вехой в истории растворения, так как открыло новые возможности для разработки препаратов на основе данных сравнительного теста кинетики растворения без необходимости прибегать к сложным исследованиям *in vivo*.

В том же 1997 году вышло ещё два важных руководства FDA, посвящённых применению испытаний на растворение при проведении масштабирования

производства или пострегистрационных изменениях как для форм немедленного, так и модифицированного высвобождения с использованием нескольких сред.

Биофармацевтическая классификационная система (БКС)

В 1985 году группой учёных из Мичиганского университета во главе с Гордоном Амидоном был сделан важный шаг в области изучения пероральных лекарственных препаратов. Они сформировали концепцию абсорбции перорального лекарственного препарата, основываясь на его растворении и дозировке, оставив в стороне теорию pH-распределения (липофильность и степень ионизации). Через десять лет, в 1995 году, эта концепция вылилась в фундаментальную работу того же авторского коллектива по разработке биофармацевтической классификационной системы (БКС, Biopharmaceutics Classification System, BCS) [26]. В БКС фармацевтические субстанции классифицируются по двум характеристикам: растворимость в водных растворах и всасываемость в желудочно-кишечном тракте. По растворимости субстанции могут быть либо хорошо растворяющимися, либо плохо растворяющимися, так же как и по всасываемости – хорошо всасывающимися и плохо всасывающимися. В комбинации эти два параметра образуют четыре класса субстанций:

Класс I – хорошо растворяющиеся, хорошо всасывающиеся;

Класс II – плохо растворяющиеся, хорошо всасывающиеся;

Класс III – хорошо растворяющиеся, плохо всасывающиеся;

Класс IV – плохо растворяющиеся, плохо всасывающиеся.

Субстанция считается хорошо растворяющейся, если её высшая зарегистрированная дозировка растворяется в среде с pH от 1 до 7,5 объёмом не более 250 мл. Причём субстанция всегда будет находиться в одном и том же классе вне зависимости от того, с какой дозировкой имеют дело в конкретном исследовании – класс определяется именно по высшей дозировке. Хорошая всасываемость означает, что в испытаниях на проницаемость *in vitro* субстанция показывает результат не менее 90%.

Такая классификация оказалась удобной для предсказания высвобождения АФИ из лекарственной формы и создала почву для поиска корреляций *in vivo – in vitro* для каждого класса с целью расширения возможностей прогнозирования поведения препаратов. Наиболее тесная корреляция была обнаружена для препаратов, содержащих субстанции класса II БКС [27], так как для них, как выяснилось, растворение лимитирует скорость поступления действующего вещества в системный кровоток.

Процедура «биовейвер», основанная на БКС

В 2000 году выходит первое, основанное на БКС руководство FDA, посвящённое возможности регистрации препарата на основании результатов испытаний *in vitro* без проведения фармакокинетических исследований *in vivo* на здоровых добровольцах. Данным руководством такая процедура допускается для лекарственных субстанций I класса БКС в твёрдых дозированных пероральных лекарственных формах с очень быстрым высвобождением (не менее 85% АФИ за 15 минут).

Для обозначения процедуры замены исследований *in vivo* на исследования *in vitro* был введён термин «biowaiver» («биовейвер»). Следует отметить, что данный термин изначально применялся для обозначения отказа от проведения испытаний *in vivo* при регистрации лекарственных препаратов с более низкими дозами активного вещества, поэтому более корректно использовать термин «биовейвер на основе БКС» («BCS based biowaiver»).

Первая статья, посвящённая процедуре «биовейвер», была опубликована в Journal of Pharmaceutical Sciences в 2004 году. В ней описывалась возможность применения процедуры для препаратов, содержащих верапамила гидрохлорид, пропранолола гидрохлорид и атенолол. В настоящее время возможность процедуры «биовейвер» рассматривается как перспективное направление разработки и регистрации лекарственных средств во всём мире.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

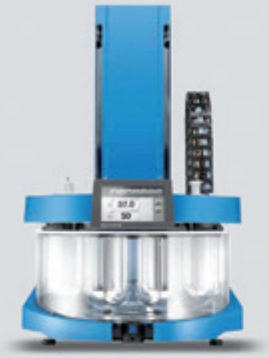
Таким образом, наука о растворении за более чем сто лет своей истории прошла путь от теоретических исследований в области физической химии до важнейшего контролирующего и прогностического инструмента современной медицины. На сегодняшний день изучение растворения лекарственных препаратов является перспективным направлением разработки и регистрации лекарственных средств: с одной стороны, помогает в создании новых лекарственных форм и фармацевтических субстанций, с другой – даёт возможность упростить процедуру регистрации воспроизведённых препаратов, заменив исследования *in vivo* на исследования *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. A.A. Noyes, W.R. Whitney. The rate of solution of solid substances in their own solutions // Journal of the American Chemical Society. 1897. Т. 19. № 12. С. 930–934.
2. A. Dokoumetzidis, P. Macheras. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system // International journal of pharmaceutics. 2006. Т. 321. № 1. С. 1–11.
3. L.J. Edwards. The dissolution and diffusion of aspirin in aqueous media // Transactions of the Faraday Society. 1951. Т. 47. С. 1191–1210.
4. E. Nelson. Solution rate of theophylline salts and effects from oral administration // Journal of the American Pharmaceutical Association. 1957. Т. 46. № 10. С. 607–614.
5. A.B. Varley. The generic inequivalence of drugs // JAMA. 1968. Т. 206. № 8. С. 1745–1748.
6. C.M. Martin et al. Brand, generic drugs differ in man // JAMA. 1968. Т. 205. № 9. С. 23–4.
7. C. MacLeod et al. Comparative bioavailability of three brands of ampicillin // Canadian Medical Association Journal. 1972. Т. 107. № 3. С. 203.
8. J.H. Tyrer et al. Outbreak of anticonvulsant intoxication in an Australian city // Br Med J. 1970. Т. 4. № 5730. С. 271–273.
9. J.C. Cloyd, R.J. Gumnit, T.S. Lesar. Reduced seizure control due to spoiled phenytoin capsules // Annals of neurology. 1980. Т. 7. № 2. С. 191–193.
10. J. Lindenbaum et al. Variation in biologic availability of digoxin from four preparations // New England Journal of Medicine. 1971. Т. 285. № 24. С. 1344–1347.
11. E.J. Fraser, R.H. Leach, J.W. Poston. Bioavailability of digoxin // The Lancet. 1972. Т. 300. № 7776. С. 541.
12. L.T. Grady. Perspective on the History of Dissolution Testing. URL: http://www.layloff.net/articles/Gradys Corner/A Perspective on the History of Dissolution Testing.pdf (дата обращения: 24.03.2016).
13. L.T. Grady. An early look at dissolution testing, including equipment, calibration, and acceptance criteria // Dissolution Technologies. 2014. Т. 21. № 3. С. 20–23.
14. P.J. Marroum. History and evolution of the dissolution test // Dissolution Technol. 2014. Т. 21. № 3. С. 11–16.
15. D.E. Wurster, P.W. Taylor. Dissolution kinetics of certain crystalline forms of prednisolone // Journal of pharmaceutical sciences. 1965. Т. 54. № 5. С. 670–676.
16. T.R. Bates, M. Gibaldi, J.L. Kanig. Rate of dissolution of griseofulvin and hexoestrol in bile salt solutions // Nature. 1966. № 5043. С. 1331-1333.
17. J.C. Tao, E.L. Cussler, D.F. Evans. Accelerating gallstone dissolution // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1974. Т. 71. № 10. С. 3917–3921.
18. P.H. Elworthy, A.T. Florence, C.B. Macfarlane. Solubilization by surface-active agents and its applications in chemistry and the biological sciences. – London: Chapman & Hall, 1968.
19. W.L. Chiou. Mechanism of increased rates of dissolution and oral absorption of chloramphenicol from chloramphenicol-urea solid dispersion system // Journal of pharmaceutical sciences. 1971. Т. 60. № 9. С. 1406–1408.
20. A.J. Jounela, P.J. Pentikäinen, A. Sothmann. Effect of particle size on the bioavailability of digoxin // European journal of clinical pharmacology. 1975. Т. 8. № 5. С. 365–370.
21. T. Higuchi. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension // Journal of pharmaceutical sciences. 1961. Т. 50. № 10. С. 874–875.
22. T.T. Wang, T.K. Kwei, H.L. Frisch. Diffusion in glassy polymers. III // Journal of Polymer Science. Part A-2: Polymer Physics. 1969. Т. 7. № 12. С. 2019–2028.
23. B. Cabana, R. O'Neil. FDA Report on Drug Dissolution // Pharmacopeial Forum. 1980. № 6. С. 71–75.
24. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms; Guidance for Industry; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1997.
25. Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations; Guidance for Industry; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1997.
26. G.L. Amidon et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability // Pharmaceutical research. 1995. Т. 12. № 3. С. 413–420.
27. J.B. Dressman, G.L. Amidon, D. Fleisher. Absorption potential: estimating the fraction absorbed for orally administered compounds // Journal of pharmaceutical sciences. 1985. Т. 74. № 5. С. 588–589.

sotax
Solutions for Pharmaceutical Testing

ЛУЧШИЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА "РАСТВОРЕНИЕ" ПО МЕТОДАМ **USP 1, 2, 5, 6** НА БАЗЕ SOTAX



Ручная система растворения AT

- Простой ручной отбор образцов с использованием стеклянной пипетки.
- Стационарный автоматический пробоотборник.
- Отдельно стоящий модуль отбора проб с направляющими для пипеток.
- Стационарный или ручные канюли.
- Автоматический отбор проб с помощью уникальной технологии HollowShaft™ через полый вал мешалки.

Полуавтоматическая версия (один инструмент)

- Оффлайн конфигурация с коллектором фракций
- UV-Vis Online конфигурация системы со спектрофотометром
- UV-Vis On/Offline системы
- HPLC Online системы с интеграцией хроматографа в систему растворения
- HPLC On/Offline системы с интеграцией хроматографа и коллектором фракций для сбора и хранения образцов

Двойная полуавтоматическая версия (два тестера растворения)

- Double Offline конфигурация двойной системы растворения с коллектором фракций
- Double UV-Vis Online конфигурация двойной системы со спектрофотометром
- Double UV-Vis On/Offline системы

Полностью автоматическая система растворения

- Offline конфигурация с коллектором образцов
- UV-Vis Online конфигурация с подключением к спектрофотометру и получением результатов в режиме реального времени
- UV-Vis On/Offline конфигурация с подключением к спектрофотометру и коллектору фракций

Полностью автоматическая система растворения

- Offline конфигурация с коллектором фракций
- UV-Vis Online конфигурация системы со спектрофотометром
- UV-Vis On/Offline системы
- HPLC Online системы с интеграцией хроматографа в систему растворения
- HPLC On/Offline системы с интеграцией хроматографа и коллектором фракций для сбора и хранения образцов

Pharmaceutical® Solutions

ООО «Фармацевтические решения» — В составе ГК «Фармконтракт»
Эксклюзивный представитель Sotax и Pharmatron на территории Российской Федерации и СНГ

115114, Россия, г. Москва, Дербеневская наб., 7/2, оф. 429
+7 (495) 648-32-60,
8 (800) 333-70-32
www.pharmsolutions.ru
info@pharmsolutions.ru

УДК 542.494

1 – Институт биохимической технологии и нанотехнологии ФГАО ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 10/2

2 – ФГБОУ ВПО «Липецкий государственный технический университет», 398600, Россия, г. Липецк, ул. Московская, 30

1 – Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology Peoples' Friendship University of Russia, 10/2, Miclukho-Maklaya str., Moskow, 117198, Russia

2 – Lipetsk State Technical University, 30, Moscow str., 398600, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail:
ponomareva.lina2011@yandex.ru

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РАЗЛОЖЕНИЯ ВЕЩЕСТВ В ВИДЕ ПОРОШКОВОЙ СМЕСИ С ИНЕРТНЫМ ВЫСОКОТЕПЛОПРОВОДЯЩИМ МАТЕРИАЛОМ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ НА ПРИМЕРЕ ЛЕВОМИЦЕТИНА И ПАРАЦЕТАМОЛА

А.В. Пономарева[1]*, А.В. Дудкин[2]

Резюме. Разработка методики определения энтальпии плавления монотропных переходов и энергии активации разложения веществ с использованием инертного высокотеплопроводящего материала методом дифференциальной сканирующей калориметрии и её практическое применение для определения весового содержания действующего вещества в твердых лекарственных препаратах.

Ключевые слова: дифференциальная сканирующая калориметрия, левомицетин, парацетамол, графит.

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINING THE THERMODYNAMIC AND KINETIC PARAMETERS OF DECOMPOSITION SUBSTANCES IN THE FORM OF THE POWDER MIXTURE WITH HIGHLY THERMALLY CONDUCTIVE INERT MATERIAL BY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY ON THE EXAMPLE OF PARACETAMOL AND CHLORAMPHENICOL

A.V. Ponomareva[1]*, A.V. Dudkin[2]

Abstract. Development of method for determining the melting enthalpy of monotropic transitions and the activation energy of substances decomposition using highly thermally conductive inert material by differential scanning calorimetry and its practical use for determining the weight content of the active substance in solid medicinal substance.

Keywords: differential scanning calorimetry, chloramphenicol, paracetamol, graphite.

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение количества лекарственных препаратов требует пропорционального увеличения аналитических методик определения содержания действующих веществ. В этой ситуации оптимальным представляется использование универсальных методов, применимых к любым формам изучаемых образцов. Если жидкие препараты достаточно хорошо могут быть исследованы методами хроматографии, то для твердых таблеток и порошков требуется не всегда простая пробоподготовка.

Определение содержания аналита в твёрдых объектах возможно методами калориметрии [3, 6]. Одним из наиболее часто используемых методов из-за сравнительно низкой стоимости и простоты является метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), основанный на измерении разности тепловых потоков в исследуемом образце и эталоне при нагреве их с одинаковой скоростью [4]. Так, например, для термического анализа в Европе (Ph. Eur., chapter 2.2.34) и Соединенных Штатах (USP, chapter 891) описаны методы дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и термогравиметрии (ТГ или ТГА) [1, 2].

Идея данного метода заключается в измерении теплового эффекта плавления или разложения вещества. Зная удельную величину энтальпии для чистого вещества и изучаемого образца, можно достаточно просто определить его содержание. Однако, согласно большинству методов, для измерения используется циклический нагрев образца, включающий в себя не менее трех стадий нагрева. Это необходимо, чтобы удалить влияние «истории образца», то есть формы (порошок, таблетка, нити и тому подобное) и влажности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использован прибор DSC 204 F1 фирмы NETZSCH, позволяющий измерять теплоемкость и теплоту процессов в интервале от –180 до 600 °С. Благодаря высокой чувствительности он позволяет изучать процессы в образцах малой массы [5].

Ход работы

Для получения образца в виде таблетки диаметром 4 мм и высотой не более 2 мм, так что масса таблеток находилась в пределах от 10 до 20 мг, использовался пресс со специально разработанной пресс-формой. Вначале препарат измельчался в тонкий порошок, затем помещался в пресс-форму и спрессовывался в течение 30 с. Затем полученную таблетку и порошок помещали в заранее взвешенный тигель, закрывали проколотой крышкой, взвешивали и определяли массу образца по разности двух весов. Тигель заваривали при помощи специального пресса, входящего в комплект прибора.

После этого тигель с образцом и пустой тигель, закрытый крышкой, помещали в печь – эталон (пустой тигель) на левую, а тигель с исследуемым веществом – на правую измерительную ячейку. Тигли располагали максимально симметрично по отношению к измерительным ячейкам.

Во многих работах по дифференциальной калориметрии подчеркивается важность механической подготовки образца: прессование в таблетки или пластинки либо растирание в порошок. И таблетка, и дисперсная форма образца имеют свои преимущества и недостатки в ДСК. В случае таблетированной формы распределение тепловых потоков в образце одно и то же, а в порошке может отличаться при распределении его по дну тигля. Соответственно влияние скорости нагрева для толстого сравнительно с крупинками порошка слоя таблетки различно.

В связи с этим были проведены измерения для обеих форм образцов. В качестве веществ для изучения были выбраны парацетамол, левомицетин. Первое вещество имеет обратимый фазовый переход – плавление и использовалось для проверки того, возможно ли при измерении ограничиться первым сегментом. Левомицетин после плавления образует аморфную массу, что делает невозможным определение его энтальпии плавления по методу ISO 11357-4 (три циклические стадии нагрев – изотермический участок – охлаждение).

Таким образом, для левомицетина невозможно определение теплот процессов обычным методом. Одна из идей данной работы состояла в том, чтобы определять энтальпии этих процессов в одной стадии нагрева, и для проверки этой возможности был использован парацетамол.

Для большинства применений дифференциальной калориметрии к органическим веществам используется скорости нагрева 10–20 К/мин.

Для изучения влияния скорости на измеряемый сигнал были проведены измерения при скоростях 10, 20, 50 и 100 К/мин для всех образцов.

Поскольку для получения термохимических данных для веществ с монотропным переходом или разложением необходимо ограничиться первым нагревом, постольку необходимо добиться максимальной теплопроводности образца и его тепловой изотропии. С этой целью использовалась смесь образца с графитом, который, помимо своей высокой теплопроводности 119–165 Вт·м$^{-1}$·К$^{-1}$, также является сравнительно химически инертным веществом.

Были проведены измерения для следующих соотношений масс образец/графит: 15/85, 50/50, 85/15 и чистого образца.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подбор оптимальных параметров измерений с использованием парацетамола

Влияние формы образца на измеряемый сигнал

Измерены зависимости ДСК-сигнала от температуры для образца в виде таблетки и порошка для скорости развертки температуры 10 К/мин (рисунок 1).

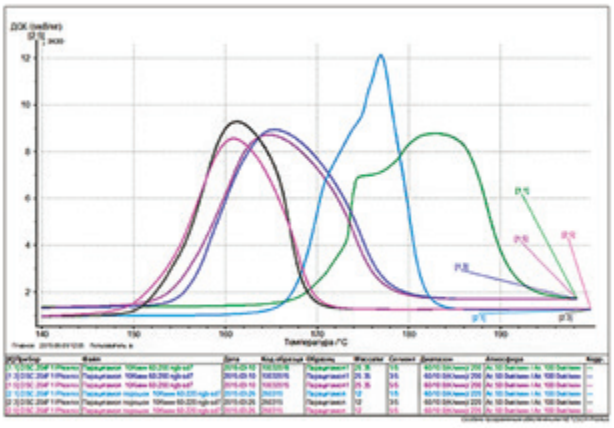


Рисунок 1. Зависимости ДСК-сигнала от температуры для парацетамола в виде таблетки (1.1, 1.3, 1.5) и порошка (2.1, 2.3, 2.5) для скорости нагрева 10 К/мин

Влияние добавления графита

Для изучения влияния добавки графита были проведены измерения со смесью парацетамол:графит = 1:1 при скоростях нагрева 10, 20 и 50 К/мин (рисунок 2).

Аналогичные измерения были проведены для смесей графита с левомицетином, но в этом случае также использовались разные соотношения масс (15:85, 50:50, 85:15 и 100%) для скоростей развертки температуры 10, 20, 30 и 40 К/мин.

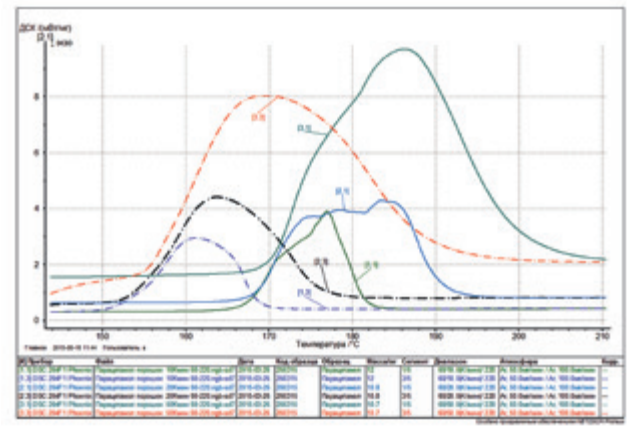


Рисунок 2. Первая (сплошные линии) и вторая (пунктирные линии) стадия нагрева порошка парацетамола для скоростей нагрева 10, 20 и 50 К/мин

лового эффекта. Кроме того, увеличение скорости развертки до 50 К/мин и более делает невозможным определение энтальпии для таблетки в отличие от порошка.

Однако и для порошковой формы парацетамола кривая первого нагрева заметно отличается от последующих (рисунок 2). Добавление графита (рисунок 3) сдвигает максимум первого нагрева в начало и сглаживает его форму. В этом случае возможно определение значения $\Delta_m H$ по первому участку.

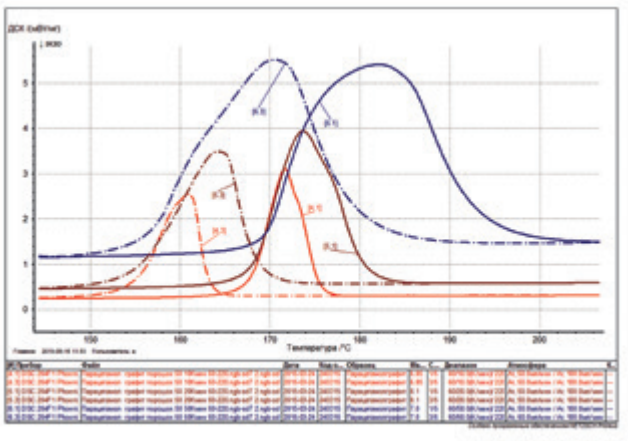


Рисунок 3. Первая (сплошные линии) и вторая (пунктирные линии) стадия нагрева смеси порошка парацетамола с графитом 50:50 для скоростей нагрева 10, 20 и 50 К/мин

Сравнительная оценка влияния добавления графита на зависимости сигнал ДСК – температура при различных скоростях нагрева и форме образца

Как следует из рисунка 1, пик для первого нагрева образца в виде таблетки начинается позже и имеет более сложную форму, чем для порошка. С увеличением скорости роста температуры это различие увеличивается. Это связано с двумя факторами:

1) анизотропностью теплового потока в пластине по сравнению с таковым для дисперсной среды, что приводит к уширению пика ДСК и его смещению в сторону больших температур;

2) с тем, что особенности применяемого для получения таблеток способа не позволяют получить образец массой менее 15 мг, а большая масса опять-таки приводит к неравномерности нагрева объекта и смещению и уширению пика сигнала. Таким образом, использование порошка позволяет уменьшить сдвиг пика вправо и получить его более острую форму, что способствует более точному определению теп-

Влияние скорости развёртки на таблетированную форму чистого парацетамола выше, чем на порошкообразную и смесь порошка с графитом. Из анализа графиков можно найти влияние скорости развертки на начальную точку плавления (таблица 1).

Из приведенных в таблице данных следует, что в наименьшей степени скорость развертки влияет на порошковую смесь вещества с графитом. Кроме этого, очевидна близость значений энтальпий плавления для смесей с графитом как в виде порошка, так и в таблетированной форме и значительное отличие теплоты для таблетки чистого парацетамола. Полученная разница может быть объяснена различием в тепловых потоках внутри образца (рисунок 1), неравномерностью и неодновременностью его плавления в таблетке.

Таким образом, показано, что измерения для порошковой смеси вещества с графитом в меньшей степени зависят от скорости развертки температуры и более воспроизводимы по теплоте процесса. В дальнейшем для измерения теплот плавления и разложения использовалась смесь порошка с графитом.

На примере левомицетина (таблица 2) можно видеть, что влияние скорости развертки температуры на измерения минимально: при увеличении скорости в четыре раза значение энтальпии меняется в пределах 5%. Это позволяет использовать для измерений высокие скорости нагрева, что повышает чувствительность измерений и уменьшает время анализа.

Результаты определения левомицетина в образцах

Для определения содержания левомицетина в трёх образцах методом ДСК были построены зависимости энтальпии плавления образца на первом участке нагрева от состава смеси образец:графит, из которых получены математические зависимости и ко-

Таблица 1.

Температуры начала плавления $T_{нач}$ и энтальпии плавления $\Delta_m H$, пересчитанные на чистый парацетамол для второго нагрева

Скорость развертки, К/мин	Таблетка чистого парацетамола		Таблетка парацетамола с графитом		Порошок чистого парацетамола		Порошковая смесь парацетамола с графитом	
	$T_{нач}$, °С	$\Delta_m H$, Дж/г	$T_{нач}$, °С	$\Delta_m H$, Дж/г	$T_{нач}$, °С	$\Delta_m H$, Дж/г	$T_{нач}$,°С	$\Delta_m H$, Дж/г
10	155,61	178,2	155,73	154,7	153,54	163,1	154,9	152,78
20	156,2	169,2	156,22	154,82	154,45	155,1	154,86	157,68
50	158,79	–	159,98	–	155,99	173,1	155,66	155,38
100	163,08	–	167,63	–	158,14	–	156	–
Наклон зависимости $T_{нач}$ от скорости развертки	0,0841		0,1354		0,0495		0,0133	
Коэффициент корреляции зависимости $T_{нач}$ от скорости развертки	0,999		0,995		0,994		0,952	

Таблица 2.

Температуры начала плавления $T_{нач}$ и энтальпии плавления $\Delta_m H$, пересчитанные на порошок левомицетина

Скорость развертки, К/мин	Левомицетин г. Пенза		Левомицетин с графитом в соотношении 15/85		Левомицетин с графитом в соотношении 50/50		Левомицетин с графитом в соотношении 85/15	
	$T_{нач}$,°С	$\Delta_m H$, Дж/г	$T_{нач}$,°С	$\Delta_m H$, Дж/г	$T_{нач}$,°С	$\Delta_m H$, Дж/г	$T_{нач}$,°С	$\Delta_m H$, Дж/г
10	149,78	98,13	149,41	99,40	149,22	96,38	149,60	102,50
20	150,73	98,85	149,94	99,50	149,65	95,68	150,19	100,80
30	150,73	101,30	150,38	102,90	150,24	101,44	150,67	101,50
40	151,24	105,70	150,86	103,50	150,35	100,8	151,28	105,13

эффициенты правильности функции ΔH–ω (таблица 3). Линейность зависимостей теплоты от состава позволяет использовать данный метод определения левомицетина в твердых образцах. При этом форма пика в присутствии графита симметричнее и проще для образцов в присутствии графита, чем без него (рисунок 4).

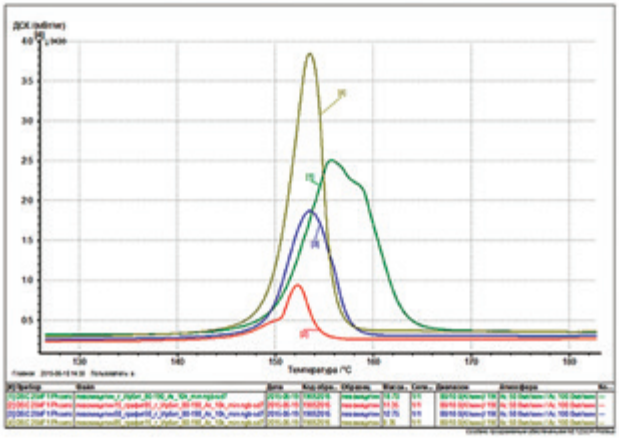


Рисунок 4. Зависимости ДСК-сигнала от температуры для левомицетина (Ирбит) без графита (1) и с весовой долей 15, 50, 85% – 2, 3 и 4 соответственно при скорости нагрева 10 К/мин

Таким образом, для определения вещества в препарате можно использовать смеси его с графитом со скоростью нагрева до 40 К/мин. В данном случае была использована скорость развертки температуры 10 К/мин только для того, чтобы можно было рассчитать значение для образца без графита, при больших скоростях искажения пика для чистого препарата не позволяют этого делать уверенно.

Таблица 3.

Экспериментальные значения теплоты плавления левомицетина в его смесях с графитом и их зависимость от состава

Левомицетин Ирбит		Левомицетин Пенза		Левомицетин Новосибирск	
состав, вес. %	теплота, Дж/г	состав, вес. %	теплота, Дж/г	состав, вес. %	теплота, Дж/г
0	0	0	0	0	0
15	16,60	15	16,10	15	15
50	54,51	50	50,41	50	45,48
85	93,32	85	90,50	85	94,25
100	110,1	100	105,10	100	111,90

Аналогичный подход можно использовать и для других препаратов, для которых невозможно провести измерения при втором и третьем нагреве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1) установлено, что добавление графита в порошковую смесь сдвигает максимум зависимости сигнал ДСК – температура влево и способствует его симметрии, что позволяет проводить опыт при больших скоростях развертки температуры;

2) показано, что использование смесей с графитом позволяет определять теплоту процесса на первой стадии нагрева, что значительно ускоряет проведение анализа;

3) подобраны оптимальные условия определения левомицетина в твердых порошках в одностадийном нагреве;

4) предложена методика определения левомицетина, использующая нагрев в одну стадию смеси порошка образца с графитом и нахождение состава по значению теплоты плавления. Данная методика может использоваться на скоростях развертки температуры 40 К/мин и более, что позволяет ограничить время анализа до пяти минут;

ЛИТЕРАТУРА

1. А. П. Арзамасцев.Применение дифференциальной сканирующей калориметрии в анализе лекарственных веществ // Фармация. 1982. № 1. С. 36–40.
2. В. Хеммингер, Г. Хене. Химия – Калориметрия. Теория и практика / Пер. с англ. О.Б Саламатиной. – М., 1989. С. 176.
3. Я. Шестак. Теория термического анализа. Физико-химические свойства неорганических веществ / Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. С. 456.
4. M. E. Brown. Introduction to Thermal Analysis. Techniques and Applications. Second Edition. – Dordrecht: Kluer Academic Publishers. 2001. P. 116–126.
5. E. Marti, E. Kaisersberger, G. Kaiser, W.-Y. Ma. Thermoanalytical Characterization of Pharmaceuticals // Netzsch Annual. 2000. P. 110.
6. K. C. Thompson. Pharmaceutical applications of calorimetric measurements in the new millennium // Thermochimica Acta. 2000. V. 355. P. 83–87.

Julabo
THE TEMPERATURE CONTROL COMPANY

PRESTO®

Максимальная производительность

- диапазон температур от -92 до +250 °C
- мобильное устройство с закрытыми боковыми стенками, не имеющими вентиляционных решёток, что позволяет разместить термостат в любом пространстве

Диапазон температур от -92 до +250 °C

Низкие температуры - уже не проблема!

PRESTO® A45 позволяет достигать -36 ° C в реакторе объемом 30 л

Мощность охлаждения до 36 кВт

Системы PRESTO® идеальны для охлаждения до низких температур

PRESTO® A80 может обеспечить эффективное охлаждение до -80 ° C

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com

УДК 615.074

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ В ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

С.С. Власов[1,2]*, С.В. Кривощеков[1,2], М.К. Заманова[2], М.В. Белоусов[1], А.М. Гурьев[1], М.С. Юсубов[1,2]

1 – ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2

2 – ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, Россия, г. Томск, пр-т Ленина, 30

1 – Siberian State Medical University, 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634055, Russia

2 – National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin Avenue, Tomsk, 634050, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: unreal800@gmail.com
Тел.: 8 (960) 974 51 40

Резюме. Проведена валидация методики количественного определения действующего вещества нового контрастного препарата на основе гексафторида серы (ГС) в плазме крови крыс. Коэффициент корреляции линейной зависимости составил 0,9990 в диапазоне концентраций ГС от 0,003 до 0,500 мкл/мл. Предел количественного определения с соотношением сигнал/шум, равным 10,12 составил 0,003 мкл/мл. Межсерийная и внутрисерийная точность от номинальных концентраций составили 100,40–101,20% и 86,67–110,0% соответственно. Коэффициенты вариации межсерийной и внутрисерийной сходимости составили 3,68–4,15% и 1,23–10,68% соответственно. Для определения стабильности анализировали образцы одной серии с концентрациями 0,01 и 0,50 мкл/мл. Для определения кратковременной стабильности образцы хранили в течение 24 часов. Для определения долговременной стабильности образцы хранили в течение 25 суток. Кратковременная стабильность при комнатной температуре составила 0,52% и 1,86%. Долговременная стабильность при –20 °С составила –90,43% и –81,81%. Точность при замораживании и оттаивании образцов составила 102,30% и 100,10%, а сходимость – 5,40% и 1,50%.

Ключевые слова: хромато-масс-спектрометрия, гексафторид серы, УЗ-контрастные средства.

VALIDATION METHOD FOR DETERMINATION OF THE SULFUR HEXAFLUORIDE IN PLASMA SAMPLES OF EXPERIMENTAL ANIMALS

S.S. Vlasov[1,2]*, S.V. Krivoshchekov[1,2], M.K. Zamanova[2], M.V. Belousov[1], A.M. Guriev[1], M.S. Yusubov[1,2]

Abstract. A new GCMS-based method for quantitative determination of active substance of new contrast drug based on sulfur hexafluoride (SH) in the rat blood plasma is produced. A ratio plot of peak area of sulfur hexafluoride to peak area of internal standard toluene [y, S(SH)/S(toluene)] versus concentration of sulfur hexafluoride (x, μL/mL) was linear over 0.003–0.500 μL/mL. The calibration graph can be described by the equation y=0.9526x+0.0037 (r^2=0.9990). Limit of quantitation (LOQ) (signal-to-noise 10,12) was 0.003 μL/mL. Inter- and intra-serial accuracy related to nominal concentrations were 100.40–101.20% and 86.67–110.0%, respectively. The RSD values for inter- and intra-serial accuracy were 3.68–4.15% and 1.23–10.68%, respectively. The samples of the same series with SH concentrations 0.01 μL/mL and 0.50 μL/mL were analyzed in order to determine the stability. Samples were stored for 24 hours to determine the short-term stability. To determine the long-term stability Samples were stored for 25 days. Short-term stability at room temperature were 0.52% and 1.86% and long-term stability at –20 °C were –90.43% and –81.81% for SH concentrations 0.01 μL/mL and 0.50 μl/ml, respectively. Accuracy during freezing and thawing of samples were 102.30% and 100.10% and RSD values were 5.40% and 1.50%, respectively.

Keywords: gas chromatography-tandem mass spectrometry, sulfur hexafluoride, ultrasound contrast agents.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ведущая роль в выявлении заболеваемости населения принадлежит методам неинвазивной диагностики, среди которых ультразвуковое исследование занимает в России одну из приоритетных позиций. Высокая распространенность данного метода обусловлена отсутствием инвазивности, лучевой нагрузки и высокой доступностью как для пациентов, так и для медицинских учреждений [1]. К сожалению, данный метод не лишен недостатков, основным из которых является недостаточная информативность, в частности, для визуализации очагов воспалительного генеза. Однако благодаря развитию фармацевтической науки и появлению на рынке контрастных препаратов для ультразвуковой визуализации данный недостаток был успешно преодолен.

Применение эхоконтрастных препаратов (ЭКП) при ультразвуковой диагностике повышает точность дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований, диагностическую эффективность установления социально значимых онкологических и кардиологических заболеваний, а также делает ультразвуковую ангиографию конкурентоспо-

собной компьютерной и магнитно-резонансной ангиографии [2].

Контрастные препараты для ультразвуковой диагностики делятся на два поколения. Отличия между препаратами разных поколений в первую очередь заключаются в увеличенном времени контрастирования у препаратов второго поколения [4, 5].

В СибГМУ (г. Томск) разрабатывается отечественный контрастный препарат, позволяющий проводить визуализацию очагов воспаления печени в ультразвуковом исследовании.

Действующим веществом нового контрастного препарата является гексафторид серы, который представляет собой бесцветный газ с очень низкой реакционной способностью, совершенно безвредный для организма и характеризующийся очень ограниченной растворимостью в воде и низким коэффициентом диффузии, что существенно повышает его стабильность в организме в сравнении с воздухом.

Для появления нового контрастного препарата на отечественном рынке необходимо разработать методику определения действующего вещества в плазме крови экспериментальных животных (крыс), которая будет обладать необходимой информативностью и достоверностью данных.

В результате целью настоящей работы являлось проведение валидации биоаналитической методики определения гексафторида серы в образцах плазмы крови крыс, основанной на газовой хромато-масс-спектрометрии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы

Для разработки методики и проведения ее валидации использовали гексафторид серы (ТУ 6-02-1249-83, ООО «Галополимер»), толуол (ч.д.а., ГОСТ 5789-78, ООО «Компонент-Реактив»), гептан (эталонный, ООО «Компонент-Реактив»).

Оборудование

Газовый хроматограф Agilent 7860 с масс-селективным квадрупольным детектором Agilent 5975 (Agilent Technologies, США), оснащенный малополярной капиллярной колонкой DB-5ms (5%-фенил-95%-метил-полисилоксановая фаза, длина 30 м, диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм) и устройством для автоматического ввода пробы. Для анализа данных использовали программное обеспечение ChemStation (G1701EA E.02.02.1431, Agilent Technologies, США), идентификацию соединений осуществляли путем сравнения полученных масс-спектров с базой масс-спектров NIST2008.L.

Условия хроматографирования

Хроматографический анализ проводили в изотермическом режиме при +50 °С. Детектирование проводили в режиме селективного ионного мониторинга. В качестве газа-носителя использовали гелий, поток газа в колонке – 1 мл/мин. Температура испарителя – 150 °С, режим ввода пробы – с делением потока 1:1, объем вводимой пробы – 1,0 мкл. Разделение проводили в режиме программирования температуры: изотерма при 50 °С в течение 10,0 мин, нагрев до 280 °С со скоростью 10 °С/мин, изотерма 5,0 мин.

Параметры масс-спектрометра

Температура источника ионов – 230 °С, температура квадруполя – 150 °С, энергия ионизации – 70 эВ. Проведение хроматографического исследования осуществляли в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по выделенным ионам: 127 Да для обнаружения гексафторида серы и 92 Да для обнаружения внутреннего стандарта – толуола. Выбор данных ионов обусловлен отсутствием их в масс-спектре растворителя – гептана. Преимущества селективного сканирования ионов заключаются в увеличении отношения сигнал/шум из-за большего времени накопления данных для интересующих ионов [6]. Главное преимущество режима селективного сканирования ионов заключается в меньшей затрате времени на детектирование ионов, не представляющих интерес для анализа, в результате чего достигаются более низкие пределы обнаружения [7].

Подготовка растворов внутреннего стандарта и калибровочных образцов

Для повышения достоверности получаемых по данной методике результатов нами использован внутренний стандарт, в качестве которого выбран толуол в концентрации 0,005 мкл/мл. Использование толуола в качестве внутреннего стандарта обусловлено следующими факторами: его время удерживания значительно отличается от времени удерживания гексафторида серы; масс-селективный детектор обладает к нему высокой чувствительностью.

Растворы внутреннего стандарта толуола готовили путем последовательного разведения концентрированного раствора в мерных колбах по следующей методике: 50 мкл толуола помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили до метки гептаном, получали раствор А. 1 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили до метки гептаном, получали раствор А1. Затем 1,25 мл раствора А1 помещали в мерную колбу вмес-

тимостью 5 мл и доводили до метки гептаном, получали раствор В. 1 мл раствора В помещали в мерную колбу вместимостью 5 мл и доводили до метки гептаном, получали раствор С. Концентрации полученных растворов А1, А, В, С составляли 5,0; 0,5; 0,125 и 0,025 мкл/мл соответственно.

Градуировочные растворы гексафторида серы готовили путем разведения насыщенного раствора. Насыщенный раствор готовили путем барботирования гексафторидом серы 4 мл гептана в течение 3 мин. Максимальная концентрация гексафторида серы в гептане составляет 1608 мкл/мл [3]. Далее 0,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили гептаном до метки (раствор С0). Затем 154 мкл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили до метки гептаном, полученный рабочий раствор (К0) имел концентрацию 1,25 мкл/мл. Для построения калибровочной кривой в диапазоне концентраций от 0,003 до 0,500 мкл/мл было приготовлено шесть стандартных растворов К1, К2, К3, К4, К5, К6 с концентрациями 0,003; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 мкл/мл соответственно. Калибровочные растворы готовили путем разведения рабочего раствора К0 и растворов внутреннего стандарта в определенных пропорциях (таблица 1).

Таблица 1.

Приготовление калибровочных растворов

Объем рабочего раствора SF6, мкл	Объем раствора внутреннего стандарта	Объем добавляемого растворителя (гептан), мл*	Концентрация SF6, мкл/мл	Концентрация внутреннего стандарта, мкл/мл
2000,0	1 мл раствора С	2,00	0,5	0,005
400,0	1 мл раствора С	3,60	0,1	
400,0	2 мл раствора С	7,60	0,05	
200,0	1 мл раствора В	23,80	0,01	
100,0	1 мл раствора В	23,90	0,005	
240,0	1 мл раствора А	98,76	0,003	

Примечание: *Указан объем растворителя, добавляемый до метки для получения соответствующих концентраций.

Подготовка анализируемых образцов

Исследования проводились на половозрелых конвенциональных аутбредных крысах (возраст – 3 месяца, масса тела крыс – 290–320 г), стока CD разводки отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Крысы находились в стандартных пластиковых клетках фирмы VELAZ на подстилке из мелкой древесной стружки по пять особей в клетке в открытом режиме. Размер клеток для крыс – 57,5×35×18,5 см. Температура воздуха в виварии – 20–23 °С, влажность – не более 50%, объем воздухообмена (вытяжка:приток) – 8:10, световой режим (день:ночь) – 1:1. Кормление животных осуществлялось дважды в день.

Животным вводили эксперементальный препарат в 0,9% растворе натрия хлорида и изотонический раствор (интактная группа) внутривенно в хвостовую вену. Далее через определенные промежутки времени отбирали образцы крови, плазму отделяли центрифугированием. При отборе образцов биологический материал помещался в цитратные вакутейнеры, в которые предварительно был добавлен 1 мл раствора внутреннего стандарта в гептане [концентрация внутреннего стандарта (толуола) в гептане составляла 0,005 мкл/мл], после чего вакутейнеры помещали в морозильную камеру на хранение при температуре –20 °С. Перед анализом образцы размораживали при комнатной температуре, центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 мин, затем отбирали аликвоту супернатанта в объеме 1 мл и помещали в виалу на 2 мл. Далее проводили непосредственное хроматографирование.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты валидации методики

Специфичность

В результате исследования на хроматограмме наблюдалось два пика с временами удерживания 2,053 мин и 7,249 мин, соответствующие гексафториду серы и толуолу (рисунок 1). Сопутствующие вещества, присутствующие в образцах, не влияют на результаты исследования. Вследствие этого обеспечивается специфичность данной методики. При исследовании образца интактной плазмы (рисунок 2) наблюдали один пик со временем удерживания 7,249 мин, соответствующий внутреннему стандарту – толуолу.

Линейность

Для определения линейности проводилось исследование шести образцов с концентрациями гексафторида серы 0,003; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 мкл/мл соответственно. По результатам анализа строили график зависимости (рисунок 3) отношения площадей пиков гексафторида серы к площади пиков толуола от концентрации гексафторида серы.

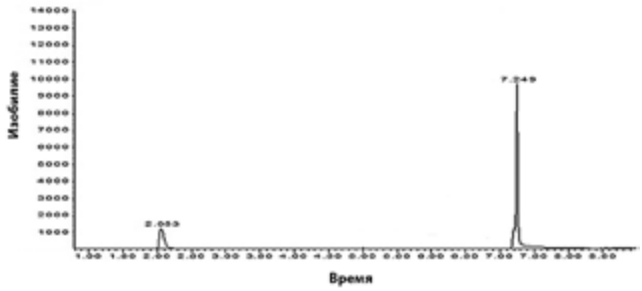


Рисунок 1. **Хроматограмма раствора гексафторида серы с внутренним стандартом – толуолом**

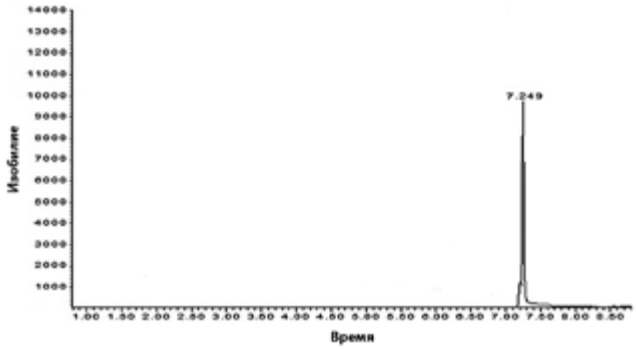


Рисунок 2. **Хроматограмма интактной плазмы с внутренним стандартом – толуолом**

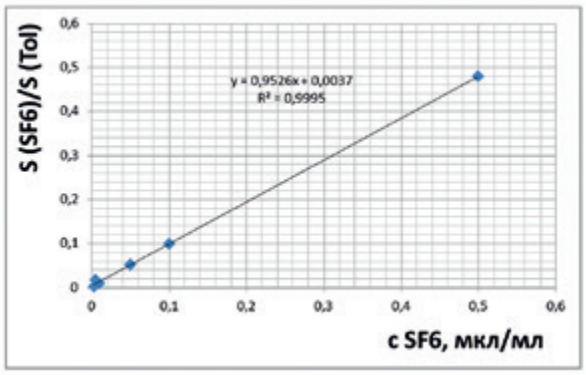


Рисунок 3. **Калибровочный график зависимости отношения площадей пиков гексафторида серы к площадям пиков внутреннего стандарта – толуола от концентраций гексафторида серы**

Исходя из построенного графика коэффициент корреляции (R^2) составляет 0,9995, а уравнение кривой имеет вид y=0,9526x+0,0037, следовательно, по полученным данным можно судить о линейности данной методики в диапазоне концентраций 0,003–0,500 мкл/мл.

Нижний предел количественного определения

Для определения нижнего предела количественного определения оценивали соотношение сигнал/шум образца с концентрацией действующего вещества 0,003 мкл/мл. Соотношение составляло 10,12. В результате чего можно судить о том, что данная методика является высокочувствительной и позволяет определять действующее вещество в минимальных концентрациях, близких или равных анализируемой.

Внутрисерийная точность и сходимость

Для определения внутрисерийной точности и сходимости анализировали 24 образца 4 концентраций, включая нижний предел количественного определения (НПКО). Результаты анализа подвергались статистической обработке (таблица 2).

Значения сходимости результатов анализа образцов с концентрациями от 0,01 мкл/мл до 0,5 мкл/мл лежат в диапазоне от 1,23% до 4,76%. В диапазоне предела количественного определения значение сходимости составляет 9,43%. Значения точности лежат в диапазоне от 86,67% до 110,00%. По данным результатам статистической обработки можно утверждать, что данная методика обладает точностью и сходимостью результатов внутри одной серии образцов и по данному показателю удовлетворяет требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам.

Межсерийная точность и сходимость

Для определения межсерийной точности и сходимости анализировали 4 серии образцов. Из каждой серии отбирали по 6 образцов 3 концентраций (всего 72 образца), 0,01; 0,1; 0,5 мкл/мл соответственно. Результаты анализа подвергались статистической обработке (таблица 3).

Значения сходимости результатов анализа лежат в диапазоне от 3,68% до 4,15%. Значения точности лежат в диапазоне от 100,40% до 101,20%. По результатам статистической обработки можно утверждать, что данная методика обладает точностью и сходимостью результатов внутри одной серии образцов.

Кратковременная стабильность

Кратковременная стабильность была подтверждена при хранении образцов в течение 24 ч при комнатной температуре. Для анализа брали 2 образца в двух концентрациях 0,01 мкл/мл и 0,50 мкл/мл соответственно. Образцы анализировали в 6 параллелях, затем рассчитывали среднее значение. Данный параметр оценивали по степени деградации, которая для образца с концентрацией 0,01 мкл/мл составила 1,86%, а для образца с концентрацией 0,50 мкл/мл составила 0,52%.

Таблица 2.

Статистическая обработка результатов анализа (n=6, P=0,95)

№ образца	Xi	Xн	Xср	S	C	A
1 (НПКО)	0,0028	0,003	0,0030	0,000283	9,43	93,33
1.2	0,0026					86,67
1.3	0,0031					103,33
1.4	0,0033					110,00
1.5	0,0029					96,67
1.6	0,0033					110,00
2	0,011	0,010	0,0103	0,00049	4,76	110,00
2.2	0,0098					98,00
2.3	0,0101					101,00
2.4	0,0102					102,00
2.5	0,0099					99,00
2.6	0,0108					108,00
3	0,1025	0,100	0,1010	0,00124	1,23	102,50
3.2	0,1012					101,20
3.3	0,0999					99,90
3.4	0,0997					99,70
3.5	0,1023					102,30
3.6	0,1001					100,10
4	0,5021	0,500	0,5220	0,01957	3,75	100,42
4.2	0,5099					101,98
4.3	0,5369					107,38
4.4	0,5482					109,64
4.5	0,5301					106,02
4.6	0,5020					100,40

Примечание: Xi – полученное значение концентрации, мкл/мл; Xн – номинальное значение концентрации образца, мкл/мл; Xср – среднее значение концентраций образцов, мкл/мл; S – стандартное отклонение; C – сходимость, %; A – точность,%.

Таблица 3.

Статистическая обработка результатов анализа (n=6, P=0,95)

	Номинальная концентрация вещества, мкл/мл											
	0,01				0,1				0,5			
Номер серии	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Xср	0,01 (100,40%)				0,101 (101,20%)				0,503 (100,60%)			
S	0,000417 (4,17%)				0,00411 (4,11%)				0,018488 (3,70%)			
C	4,15				4,06				3,68			
A	100,40				101,20				100,50			

Долговременная стабильность

Для исследования долговременной стабильности образцы плазмы с концентрациями 0,01 мкл/мл и 0,50 мкл/мл оставляли на хранение при –20 °C в течение 25 суток для последующего анализа. Оба образца анализировали перед замораживанием и после оттаивания в 3 параллелях и рассчитывали среднее значение. Результаты анализа подвергали статистической обработке (таблица 4).

Таблица 4.

Статистическая обработка результатов исследования долговременной стабильности (n=6, P=0,95)

Номер образца	1	2
Xн, мкл/мл	0,01	0,50
Xср, мкл/мл (до замораживания)	0,0103	0,5285
Xср, мкл/мл (после оттаивания)	0,00098	0,09613
Убыль, %	90,43	81,81

Точность и сходимость результатов по стабильности при замораживании и оттаивании

Для исследования точности и стабильности при размораживании образцы плазмы с концентрациями 0,01 мкл/мл и 0,50 мкл/мл оставляли на хранение при –20 °C в течение 14 дней для последующего анализа. Оба образца анализировали в 6 параллелях и рассчитывали среднее значение. Результаты анализа подвергали статистической обработке (таблица 5).

Точность результатов анализа составила 102,30% и 100,10%, сходимость – 5,40% и 1,50% соответственно, что свидетельствует о подтверждении стабильности при данных условиях.

Таблица 5.

Статистическая обработка результатов анализа (n=6, P=0,95)

Номер образца	1	2
Хн, мкл/мл	0,01	0,5
Хср, мкл/мл	0,0102	0,5005
S	0,000538	0,007605
C, %	5,40	1,50
A, %	102,30	100,10

3.2. Оценка концентрации гексафторида серы после однократного введения препарата крысам в эффективной дозе

Препарат вводился в концентрациях 4 мкл/кг и 15 мкл/кг. Плазма отбиралась через установленные промежутки времени. Концентрация гексафторида серы в плазме крови выражалась в нл/мл. Рассчитывались средние значения полученных результатов, а также стандартное и относительное отклонение (таблицы 6, 7). Усредненные фармакокинетические профили приведены на рисунке 4.

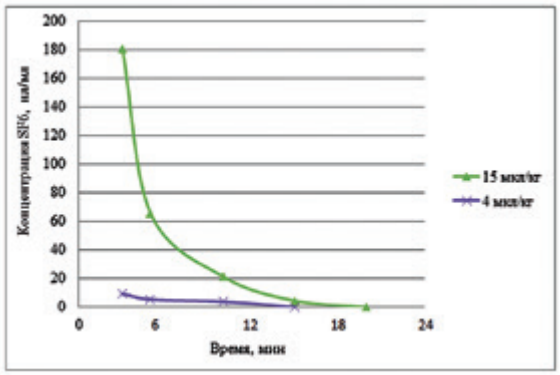


Рисунок 4. Фармакокинетический профиль препарата на основе гексафторида серы в дозировках 15 и 4 мкл/кг

Таблица 6.

Концентрации гексафторида серы в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 15 мкл/кг

Концентрация SF_6, нл/мл	Время, минут				
	3	5	10	15	20
Хср	180,84	65,37	21,31	4,39	0,00
S	2,16	1,96	0,51	0,16	0,00
CV, %	1,17	3,04	2,48	3,71	0,00

Примечание: CV – коэффициент вариации, %.

Таблица 7.

Концентрации гексафторида серы в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг

Концентрация SF_6, нг/мл		Время, мин		
	3	5	10	15
Хср	9,75	5,58	3,92	0,00
S	0,16	0,15	0,07	0,00
CV, %	1,67	2,60	1,73	0,00

Таким образом, валидирована биоаналитическая методика определения гексафторида серы в образцах плазмы крови крыс. Методика апробирована в предварительном эксперименте по исследованию фармакокинетики контрастного препарата на основе гексафторида серы. Предварительное исследование фармакокинетики показало быструю элиминацию гексафторида серы. Полная элиминация лекарственного вещества наступает в течение 20 мин. При последующих экспериментах рекомендуется проводить более частый отбор проб.

ЛИТЕРАТУРА

1. В.П. Куликов, К. Вольф. Ультразвуковая диагностика сосудистых заболеваний. – М.: МЕДпресс-информ, 2011. 320 с.
2. M. Lin. Diagnostic performance of contrast – enhanced ultrasound for complex cystic focal liver lesions: blinded reader study // J. Eur. Radiol. 2009. P. 358–369.
3. А.А. Опаловский, Е.У. Лобков. Гексафторид серы // Успехи химии. 1975. Т. 44. № 2. С. 193–213.
4. Патент РФ № 2485976. Контрастное средство для ультразвуковой визуализации. Заявл. 17.05.2011; опубл. 27.03.2013, бюл. № 18. 9 с.
5. S. De Castro, L. Agati, D. Cartoni. Harmonic imaging with Levovist for transthoracic echocardiographic reconstruction of left ventricle inpatients with post-ischemic left ventricular dysfunction and suboptimal acoustic windows // J. Am. Soc. Echocardiogr. 2000. P. 139–145.
6. Аналитическая химия. Проблемы и подходы: в 2 т.: пер. с англ. Т. 2 / Под ред. Р. Кельнера, Ж. Мерме и др. – М.: Мир; АСТ, 2004. С. 298.
7. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. Т. 2. С. 265.

УДК 615.275.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПРОТАРГОЛА НА ФИБРОБЛАСТЫ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА

Н.В. Мещерякова[1,3], Э.Б. Дашинимаев[2,3], А.И. Марахова[1]*

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

2 – ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Россия, г. Москва, ул. Вавилова, 26

3 – ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия, ул. Островитянова, 1

1 – Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 26, Vavilova str., Moscow, 119334, Russia

3 – Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: agentcat85@mail.ru
Тел.: 8 (499) 936 85 99

Резюме. В статье представлены данные по изучению влияния различных концентраций протаргола на жизнедеятельность фибробластов. Для оценки метаболической активности клеток использовали МТТ-тест – колориметрический тест, основанный на способности НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктазных ферментов отображать количество жизнеспособных клеток. Установлено, что критическая концентрация протаргола, оказывающая максимально ингибирующее действие на пролиферацию фибробластов дермы, находится в диапазоне $2 \cdot 10^{-2} – 5 \cdot 10^{-1}$ мг/мл.

Ключевые слова: наночастицы, коллоидное серебро, цитостатическое действие, фибробласты дермы человека.

DEFINITION OF CYTOSTATIC EFFECT OF PROTARGOLUM SOLUTIONS IN DIFFERENT CONCENTRATIONS ON HUMAN DERMAL FIBROBLASTS

N.V. Mescheryakova[1,3], E.B. Dashinimaev[2,3], A.I. Marakhova[1]*

Abstract. This article presents the data on the effect of protargolum solutions in different concentrations on human dermal fibroblasts. For evaluation of the metabolic activity of the cells MTT-test was used. This test is based on the ability of NAD-H-adjective oxydoreductases to represent the amount of viable cells. It was determined, that the critical concentration of protargolum solution, responsible for inhibitory effect on fibroblasts proliferation is on the range $2 \cdot 10^{-2} – 5 \cdot 10^{-1}$ mg/ml.

Keywords: nanoparticls, colloidal silver, cytostatic effect, human dermal fibroblasts.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день причиной смерти четверти населения планеты являются различные бактериальные и грибковые инфекции. Одной из причин неэффективного лечения антибиотиками является развитие резистентности к ним микробов. Наночастицы металлов и их оксидов обладают значительным антимикробным действием и являются наиболее перспективными заменителями антибиотиков [1]. Наиболее часто находят применение соединения серебра, как правило используемые местно. Давно применяются в медицинской практике в качестве антисептических, противовоспалительных средств местного действия такие препараты, как колларгол и протаргол [2].

Несмотря на ряд опубликованных научных работ о влиянии наночастиц серебра на живой организм, данные весьма разрозненны. Механизмы воздействия наночастиц на клеточном уровне изучены недостаточно, особенно скудно в литературе представлены данные, касающиеся внутриклеточных изменений, возникающих в коже при взаимодействии с наночастицами. Описанные же результаты исследований нередко противоречат друг другу. До сих пор не сложилась методология прогноза генотоксического риска применения наночастиц человеком [3].

Все вышесказанное обусловливает актуальность систематического и углубленного изучения влияния наночастиц серебра на метаболические процессы, протекающие в живой клетке.

Целью настоящего исследования стало определение цитотоксического действия различных концентраций протаргола на фибробласты дермы человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с клеточной культурой

Линия иммортализованных фибробластов кожи человека 1608-hTERT была любезно предоставлена доктором Е.Е. Егоровым (ИМБ РАН, г. Москва, Россия). Данные клетки были выделены из кожи соматически здорового донора и иммортализованы при помощи введения гена каталитического компонента теломеразы (hTERT) под конститутивно-

активно работающим промотором CMV [4]. Все работы с клетками производили в стерильных условиях ламинарного шкафа 2-го уровня биобезопасности. Выращивание клеток проводили в культуральных флаконах и 96-луночных плоскодонных планшетах на полной питательной среде (DMEM, 2 ммоль L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 10% ЭТС) в CO_2-инкубаторе с подавлением кислорода, при +37°С, 5%O_2, 5%CO_2, 100% влажности. Пересев клеток осуществляли при помощи растворов Версена и трипсин-ЭДТА по стандартной методике [4]. Осаждение клеток осуществляли в центрифуге при 1200–1500–1800 об/мин при комнатной температуре.

Инкубирование клеточной культуры с протаргола

Протаргол растворяли в ППС в концентрации 20 мг/мл, данную концентрацию принимали за 100%-й стоковый раствор протаргола. На третий день культивирования фибробластов на 96-луночных планшетах во всех лунках производили замену среды с добавлением раствора протаргола согласно таблицам 1, 2. Смену среды производили каждый четвертый день.

Постановка МТТ-теста-1, -2

Было проведено два МТТ-теста (МТТ-тест-1, МТТ-тест-2). Снятие результатов производилось на 2, 4, 6, 8, 10-й (МТТ-тест-1, МТТ-тест-2) дни культивирования фибробластов с протарголом. При проведении МТТ-теста в каждую лунку (кроме крайних) планшета добавляли по 10 мкл МТТ (5 мг/мл). Содержимое лунок планшета перемешивали на шейкере в течение 5 мин. Инкубировали планшет 4 ч при 37 °С и 5% CO_2. Затем супернатант удаляли, формазан растворяли в 150 мкл ДМСО, планшет инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Оптическая плотность снималась при длине волны 595 нм (при длине волны сравнения 655 нм).

Таблица 1.

Распределение назначения лунок для МТТ-теста-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
C	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
D	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
E	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
F	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
G	PBS	ППС	контроль	100%	75%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Примечание: PBS – фосфатно-солевой буфер, контроль – контрольные лунки без добавления протаргола, ППС – полная питательная среда, n% – объемное содержание стокового раствора протаргола.

Таблица 2.

Распределение назначения лунок для МТТ-теста-2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
C	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
D	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
E	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
F	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
G	PBS	ППС	контроль	5%	2,5%	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,001%	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Примечание: PBS – фосфатно-солевой буфер, контроль – контрольные лунки без добавления протаргола, ППС – полная питательная среда, n% – объемное содержание стокового раствора протаргола.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведения МТТ-теста-1, -2 (4-й, 10-й дни) представлены на рисунках 1, 2.

С понижением концентрации протаргола наблюдается постепенное снижение выживаемости клеток. Максимальное снижение имеет место при $2 \cdot 10^{-2} – 5 \cdot 10^{-1}$ мг/мл. При концентрации ниже $1 \cdot 10^{-2}$ мг/мл имеет место значительное повышение выживаемости клеток. Кроме того, не выявлено существенных изменений влияния протаргола на клетки в разные дни культивирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, цитотоксичноть протаргола на дермальные фибробласты человека зависит от концентрации лекарственного препарата, однако не находится в линейной зависимости от нее. Критическая концентрация протаргола, оказывающая максимальное цитотоксическое действие на фибробласты дермы человека, находится в диапазоне $2 \cdot 10^{-2} – 5 \cdot 10^{-1}$ мг/мл. Также не выявлено существенных изменений влияния протаргола на клетки в зависимости от времени культивирования, что может указывать на отсутствие накопительного эффекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. S.T. Khan, J. Musarrat, A.A. Al-Khedhairy. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status // Colloids Surf. B. Biointerfaces. 2016. V. 146. P. 70–83.
2. Е.С. Березина, М.М. Смирнова, А.В. Петухова. Технологические аспекты и методы контроля растворов колларгола и протаргола различных концентраций // Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов: от разработки до коммерциализации: Материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию ПГФА. Пермь. 2011. С. 47–50.
3. А.Д. Дурнев. Оценка генотоксичности наночастиц при использовании в медицине // Гигиена и санитария. 2014. № 2(93). С. 76–83.
4. Е.Е. Егоров, М.В. Молдавер, Х.С. Вишнякова, С.М. Терехов и др. Усиление контроля пролиферации в теломеризованных клетках // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 2. С. 105–119.

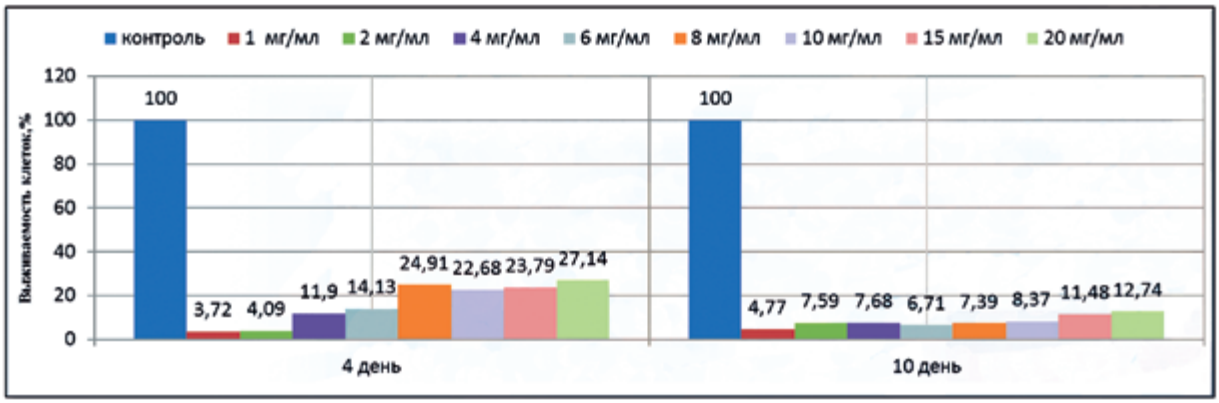


Рисунок 1. Результаты МТТ-теста-1

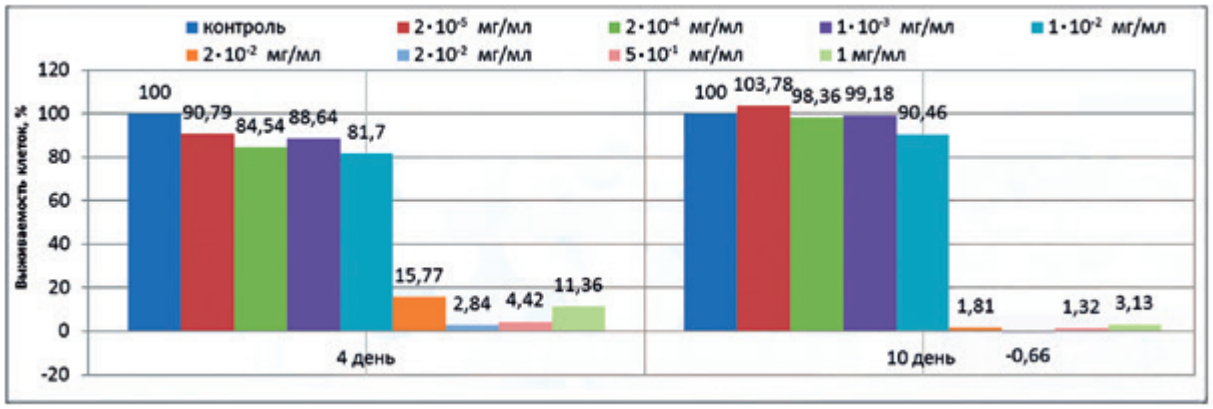


Рисунок 2. Результаты МТТ-теста-2

ГОТОВЫЕ РЕШЕНИЯ ПО СОЗДАНИЮ И ОСНАЩЕНИЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛИНИК (ВИВАРИЕВ) ПО СТАНДАРТАМ GLP

ВИВАРИЙ - ВАЖНАЯ ЧАСТЬ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИСПЫТАТЕЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ, ЗАНИМАЮЩИХСЯ РАЗРАБОТКОЙ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт» оказывает широкий спект услуг по созданию вивария с нуля, проводит реконструкцию объекта, выполняя проектирование, строительно-монтажные работы и оснащая/переоснащая помещения соответствующим типом оборудования от известных мировых производителей, для проведения доклинических исследований инновационных лекарственных препаратов, дженериков, БАВ.

Помещения для содержания животных
SPF-животных и нестерильных конвенциональных животных

Биохимические и гематологические лаборатории

Гистологические лаборатории

Помещения для хранения фармацевтических субстанций и препаратов

Соответствующая международным стандартам GLP лаборатория доклинических испытаний позволяет проводить исследования по изучению токсикологических воздействий на живой организм, оценку эффективности действия разработанных молекул на патофизиологические состояния биологических тест-систем, фармакокинетики и фармакодинамики препаратов.

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com

УДК 615.03

ЭКСПРЕСС-МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНАЛАПРИЛА И ЕГО ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА ЭНАЛАПРИЛАТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Т.А. Родина[1,2*], Е.С. Мельников[2,3], С.А. Белков[1,2,3], А.В. Соколов[1,3], А.Б. Прокофьев[1,2,3], А.С. Сивков[3]

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Россия, г. Москва, Петровский б-р, 8, стр. 2

2 – ГБУ города Москвы «Городская клиническая больница им. И.В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы», 119027, Россия, г. Москва, Яузская ул., 11

3 – ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

1 – Scientific Center for Expertise of Medicinal products of the Ministry of Health, 8/2, Petrovsky boulevard, Moscow, 127051, Russia

2 – The Moscow Department of Health I.V. Davydovsky City Clinical Hospital, 11, Yauzskaya str., Moscow, 119027, Russia

3 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: semina_tatiana@mail.ru

Резюме. Предложена экспресс-методика одновременного определения эналаприла и эналаприлата в сыворотке крови человека с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС. Разработанную методику отличает простота выполнения пробоподготовки, короткое время анализа и аналитический диапазон для обоих определяемых веществ от 5,00 до 250,00 нг/мл. Данная методика удобна при проведении рутинных исследований, в частности для осуществления терапевтического лекарственного мониторинга, выполнения аналитического этапа исследований биоэквивалентности и оценки взаимозаменяемости препаратов эналаприла.

Ключевые слова: эналаприл, эналаприлат, ВЭЖХ-МС/МС, терапевтический лекарственный мониторинг, биоэквивалентность, взаимозаменяемость.

EXPRESS METHOD FOR DETERMINATION OF ENALAPRIL AND ENALAPRILAT IN HUMAN SERUM BY HPLC-MS/MS

T.A. Rodina[1,2*], E.S. Melnikov[2,3], S.A. Belkov[1,2,3], A.V. Sokolov[1,3], A.B. Prokofiev[1,2,3], A.S. Sivkov[3]

Abstract. The express method for simultaneous determination of enalapril and enalaprilat in human serum using HPLC-MS/MS is proposed. A simple sample preparation procedure, short analysis time, and a wide analytical range for both analytes (5.00 to 250.00 ng/mL) characterize this method. This technique is useful for carrying out routine research, such as therapeutic drug monitoring, bioequivalence studies and evaluation of the interchangeability of enalapril drug products.

Keywords: enalapril, enalaprilat, HPLC-MS/MS, therapeutic drug monitoring, bioequivalence, interchangeability.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение артериальной гипертензии (АГ) в нашей стране, прежде всего как социально значимой медицинской проблемы [1, 2] в связи с риском сердечно-сосудистых осложнений и смерти [3], проводится различными лекарственными средствами. Одним из них является эналаприл, широко применяемый в медицинской практике и доказавший свою высокую эффективность [4–7]. В связи со своей значимостью данное лекарственное средство включено в перечень ЖНВЛП [8].

Метаболизм эналаприла (Э), являющегося пролекарством, происходит путём гидролиза под действием фермента карбоксилэстеразы, приводя к образованию активной формы – эналаприлата (ЭТ) (рисунок 1) [9–14]. Генетический полиморфизм, лекарственные взаимодействия и другие аспекты являются важными факторами, определяющими изменчивость терапевтического ответа при применении препаратов, являющихся субстратами карбоксилэстеразы человека [13, 14]. В связи с этим оптимальным способом подбора индивидуальной дозы эналаприла для пациен-

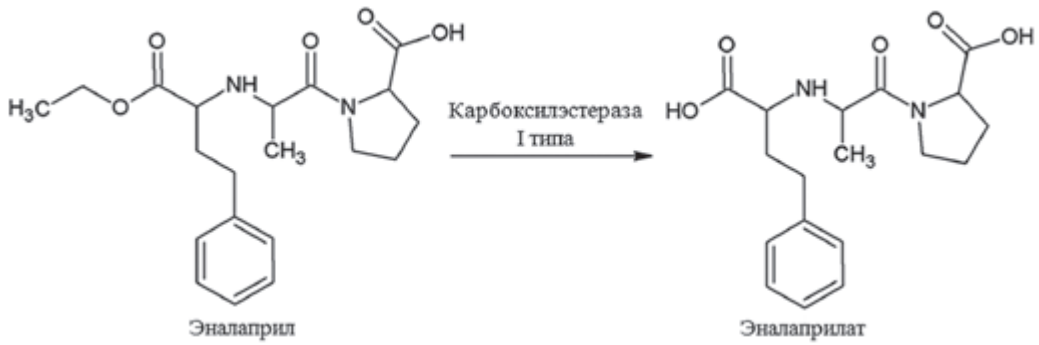


Рисунок 1. Схема метаболизма эналаприла под действием карбоксилэстеразы I типа

та в зависимости от его фенотипа является проведение терапевтического лекарственного мониторинга. Контроль артериального давления и титрование дозы препарата также являются достаточно эффективным способом персонализации терапии, однако реализация данного подхода требует больших временных затрат, чем непосредственное измерение концентрации эналаприла и эналаприлата в сыворотке крови человека.

В связи с этим целью нашей работы было создание экспрессной, чувствительной методики с максимально простой пробоподготовкой для определения эналаприла и эналаприлата в сыворотке крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на оборудовании фирмы Shimadzu (Япония), система ВЭЖХ Nexera LCMS-8040 (QQQ).

В работе использовали следующие реактивы: ацетонитрил (supergradient for UPLC, Panreac, Испания), муравьиная кислота (Fluka, for mass-spectrometry, США), деионизированная вода (электросопротивление – 18,2 МОм·см). Для приготовления калибровочных растворов использовали эналаприла малеат (1235300 USP, SigmaAldrich, США), эналаприлат (43301 SIGMA-ALDRICH, SigmaAldrich, США) и прометазина гидрохлорид (P4651 SIGMA, SigmaAldrich, США). Разделение осуществляли на колонке Synergi Polar RP, 50×2 мм, 4 мкм, 80 Å (Phenomenex, США), с универсальной предколонкой C18, 4×3,0мм (Phenomenex, США), при температуре 40 °C. Подвижная фаза состояла из элюента А [1% (об.) муравьиной кислоты/деионизированная вода] и элюента В [1% (об.) муравьиной кислоты/ацетонитрил]. Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 1, градиент по скорости потока представлен в таблице 2. Объем вводимой пробы – 2 мкл.

В качестве внутреннего стандарта использовали прометазин, как вещество, практически не применяемое в наши дни в клинической практике, что исключает возможность его нахождения в исследуемых образцах.

При ионизации использовали метод электрораспыления (ESI) в положительном режиме. Детектирование проводилось в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). В данном случае ионы-предшественники соответствовали протонированным молекулярным ионам, а именно: для Э – 377,20 m/z, для ЭТ – 349,30 m/z и для прометазина – 285,10 m/z. Параметры детектирования в режиме MRM$^+$ и энергия соударений подобраны экспериментально и представлены в таблице 3. Время удерживания Э составляло около 1,04 мин, ЭТ – около 0,94 мин, прометазина – около 1,20 мин.

Разделение проводили в режиме градиентного элюирования. Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 1. Градиент по скорости потока представлен в таблице 2. Параметры детектирования в режиме MRM$^+$ и энергия соударений подобраны экспериментально и представлены в таблице 3.

Таблица 1.

Градиент по составу подвижной фазы

Время анализа, мин	Объёмная доля элюента В, %
0,00 → 0,20	5
0,20 → 0,21	5 → 37
0,21 → 0,90	37 → 39
0,90 → 0,91	39 → 47
0,91 → 1,45	47
1,45 → 1,86	47 → 100
1,86 → 2,10	100
2,10 → 2,20	100 → 5
2,20 → 3,00	5

Таблица 2.

Градиент по скорости потока

Время анализа, мин	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00 → 0,20	0,4
0,20 → 0,21	0,40 → 0,60
0,21 → 0,75	0,60
0,75 → 0,76	0,60 → 0,90
0,76 → 2,25	0,90
2,25 → 2,26	0,90 → 0,40
2,26 → 3,00	0,40

Таблица 3.

Параметры детектирования Э, ЭТ и прометазина в режиме MRM+

Вещество	Ион-предшественник, m/z	Фрагментный ион, m/z	Энергия соударений, В
Э	377,20	234,20	-35,0
ЭТ	349,30	117,10	-35,0
Прометазин	285,10	86,10	-20,0

Пробоподготовка осуществлялась путём осаждения белков сыворотки крови 50% раствором ТФУ в воде. Для этого к 400 мкл исследуемой сыворотки (либо 360 мкл интактной сыворотки крови человека с прибавлением 40 мкл рабочего стандартного раствора Э и ЭТ) добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта (прометазин с концентрацией 250 нг/мл), 200 мкл 50% раствора ТФУ в воде, встряхивали в течение 15 с на лабораторном шейкере типа «вортекс». Далее пробу центрифугировали 15 мин со скоростью 14000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики проведена в соответствии с требованиями «Руководства по экспертизе лекарственных средств», том I [15].

При оценке селективности был проведён анализ 6 образцов интактной сыворотки крови человека из разных источников, образцов интактной сыворотки крови человека с прибавлением стандартного раствора Э в диапазоне концентраций 5–250 нг/мл, стандартного раствора ЭТ в диапазоне концентраций 5–250 нг/мл и раствора внутреннего стандарта прометазина с концентрацией 6,25 нг/мл.

На хроматограммах образцов интактной сыворотки крови человека отсутствовали пики с временами удерживания, соответствующими временам удерживания Э, ЭТ и прометазина (рисунки 2, 3).

Для проведения калибровки проводили анализ 9 образцов интактной сыворотки крови человека с прибавлением стандартных растворов до получения концентраций: 5 нг/мл, 15 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл, 75 нг/мл, 100 нг/мл, 150 нг/мл, 200 нг/мл, 250 нг/мл для Э и ЭТ. Полученные калибровочные графики, а также уравнения прямых и коэффициенты корреляции приведены на рисунках 4, 5.

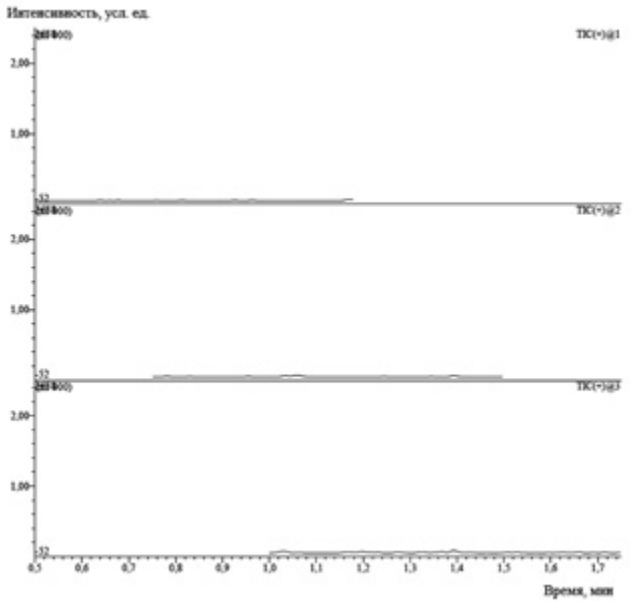


Рисунок 2. **Хроматограмма образца интактной сыворотки**

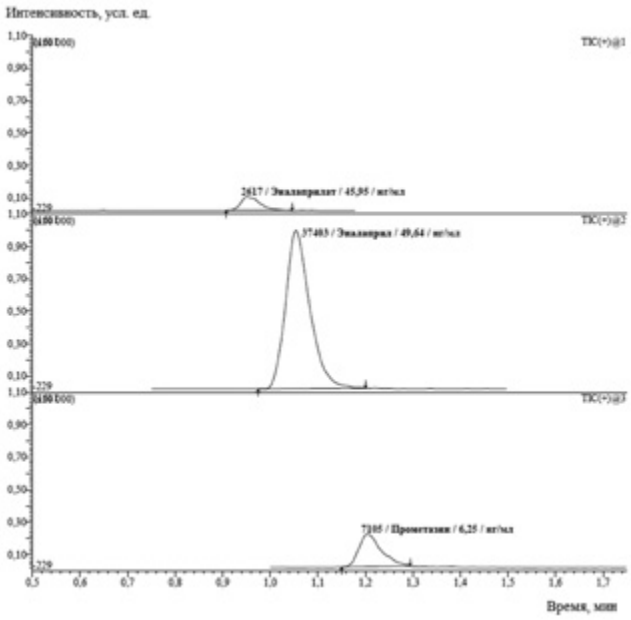


Рисунок 3. **Хроматограмма образца интактной сыворотки крови человека с прибавлением стандартных растворов Э, ЭТ и прометазина**

Полученные коэффициенты корреляции соответствовали норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в таблицах 4, 5.

При оценке точности и прецизионности проводили анализ 4 образцов интактной сыворотки крови человека с прибавлением стандартных растворов до получения концентраций: 5 нг/мл, 15 нг/мл, 100 нг/мл, 250 нг/мл для ЭТ и 5 нг/мл, 15 нг/мл, 100 нг/мл, 250 нг/мл

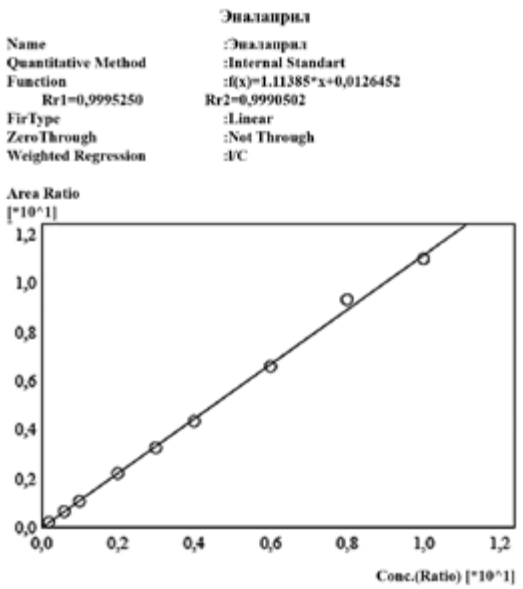


Рисунок 4. **Калибровочный график для эналаприла от концентрации в сыворотке крови человека**

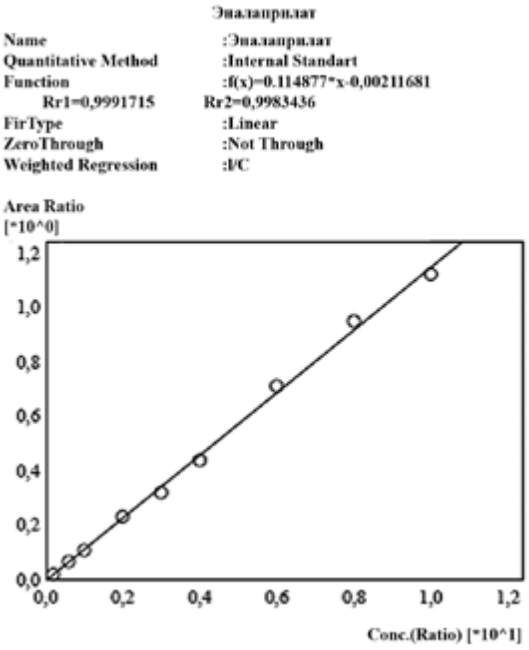


Рисунок 5. **Калибровочный график для эналаприлата от концентрации в сыворотке крови человека**

для Э. Анализ проводили в рамках 3 циклов, включавших по 5 образцов для каждого уровня концентраций. Точность и прецизионность определяли внутри аналитического цикла и между циклами. Были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), приведенные в таблицах 4, 5.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20% для нижнего диапазона линейности, не более 15% для остальных точек).

Таблица 4.

Точность и прецизионность методики для ЭТ

	Внутри цикла			Между циклами		
введено (нг/мл)	найдено (нг/мл), среднее (n=5)	RSD, % (n=5)	E, %	найдено (нг/мл), среднее (n=15)	RSD, % (n=15)	E, %
5,00	5,07	10,09	1,44	5,20	7,53	3,93
15,00	16,10	3,44	7,35	15,58	5,42	3,88
100,00	96,89	4,71	–3,11	101,25	7,56	1,25
250,00	279,54	1,56	11,82	277,59	4,57	11,03

Таблица 5.

Точность и прецизионность методики для Э

	Внутри цикла			Между циклами		
введено (нг/мл)	найдено (нг/мл), среднее (n=5)	RSD, % (n=5)	E, %	найдено (нг/мл), среднее (n=15)	RSD, % (n=15)	E, %
5,00	4,98	6,35	–0,40	5,03	7,02	0,56
15,00	14,81	5,28	–1,24	15,24	3,49	1,63
100,00	101,24	3,52	1,24	104,61	7,44	4,61
250,00	262,16	5,25	4,86	265,74	5,46	6,30

При оценке влияния биологической матрицы на сигнал детектора при анализе Э, ЭТ и прометазина рассчитывали фактор матрицы как соотношение площади пика исследуемого вещества на хроматограмме образца сыворотки крови с добавлением стандартных растворов после осаждения белков (А) к площади пика исследуемого вещества на хроматограмме

образца, приготовленного с заменой сыворотки крови равным объёмом воды и с добавлением стандартных растворов Э, ЭТ и прометазина (Б). Эффект матрицы был определён на уровнях диапазона 5 нг/мл и 250 нг/мл для ЭТ, 5 нг/мл и 250 нг/мл для Э и 6,25 нг/мл для прометазина.

Степень извлечения Э, ЭТ и прометазина из сыворотки крови в процессе пробоподготовки рассчитывали как соотношение площади пика исследуемого вещества на хроматограмме образца сыворотки крови с добавлением стандартных растворов до осаждения белков (В) к площади пика исследуемого вещества на хроматограмме образца сыворотки крови с добавлением стандартных растворов после осаждения белков (А). Степень извлечения была определена на уровнях диапазона 15 нг/мл и 250 нг/мл для ЭТ, 15 нг/мл и 250 нг/мл для Э и 6,25 нг/мл для прометазина. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Оценка эффекта матрицы и степени извлечения при анализе

	Концентрация Э, нг/мл		Концентрация ЭТ, нг/мл		Концентрация прометазина, нг/мл
	5	250	5	250	25
Эффект матрицы (А/Б)	0,69	0,63	0,70	0,73	0,86
Степень извлечения (В/А)	0,56	0,68	0,81	0,86	0,24

Методика разрабатывалась таким образом, чтобы добиться максимально возможной степени извлечения для ЭТ при максимально простом и быстром процессе пробоподготовки. К сожалению, нами была отмечена низкая степень извлечения прометазина из образцов. Однако внутренний стандарт добавляется во все анализируемые пробы в равном количестве, что делает несущественным влияние степени извлечения на результаты анализов. В практической деятельности лаборатории достаточно удобно использовать одно и то же вещество в качестве внутреннего стандарта для определения широкого круга лекарственных веществ по разным методикам. При таком подходе существует возможность дополнительно контролировать состояние оборудования путём сравнения времён удерживания и площадей пиков прометазина на хроматограммах, полученных в разное время. Прометазин нами используется как внутренний стандарт при определении карбамазепина и карбамазепин-10,11-эпоксида [16]. Кроме того, нами было показано, что стандартный раствор прометазина имеет высокую стабильность и его концентрация не изменяется в течение 1 года в условиях хранения при температуре от 4 до 8 °С. Данные в таблице 6 свидетельствуют о том, что для всех трёх веществ наблюдается подавляющее ионизацию влияние матрицы, тем не менее предложенная методика позволяет добиться желаемого нижнего предела количественного определения (нПКО) как для Э, так и для ЭТ.

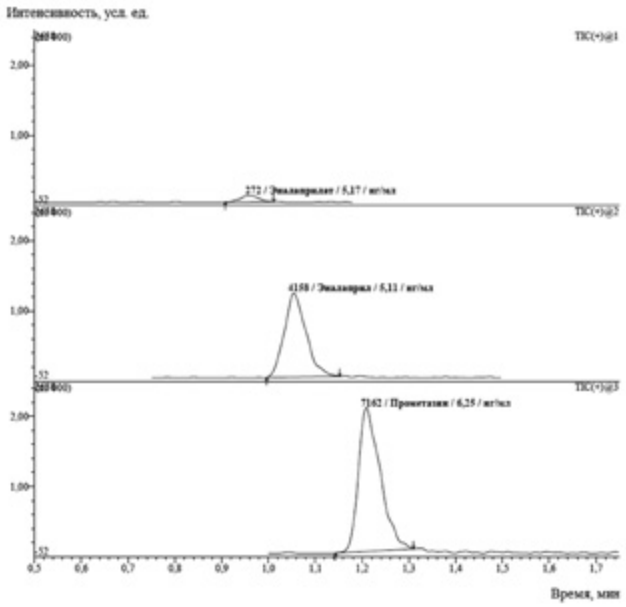


Рисунок 6. Хроматограмма образца сыворотки крови человека с содержанием Э и ЭТ на уровне нПКО

За нПКО методики принималась минимальная концентрация Э и ЭТ в сыворотке крови человека, для которой возможно определение Э и ЭТ со значениями RSD и E не более 20% в диапазоне линейной зависимости. нПКО методики составил 5 нг/мл для Э и ЭТ, при этом соотношение сигнал/шум имело значение более 10.

Стабильность исходного и рабочих стандартных растворов Э и ЭТ подтверждена при хранении в течение 6 месяцев при температуре –30 °С. Доказана кратковременная стабильность приготовленных проб в течение 24 часов при хранении в автосамплере хроматографа при температуре 4 °С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная методика заменила разработанную и опубликованную нами ранее [17] и в настоящее время применяется в ЦПМ ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского ДЗМ» для проведения фар-

макокинетических исследований с целью оптимизации фармакотерапии эналаприлом при заболеваниях сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертензия, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца и др.). Предложенная в настоящей работе методика отличается от предыдущей экспрессностью (время хроматографического анализа – 3 минуты), что обеспечивает экономию реактивов. Кроме того, использование метода внутреннего стандарта при количественном определении позволяет получать более стабильные результаты по сравнению с методом абсолютной калибровки даже в условиях снижения чувствительности детектора вследствие загрязнения.

Кроме того, широкий аналитический диапазон от 5 до 250 нг/мл как для Э, так и для ЭТ позволяет использовать данную методику для выполнения аналитического этапа исследований биоэквивалентности и оценки взаимозаменяемости препаратов эналаприла.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Mancia et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) // Blood pressure. 2013. V. 22. №. 4. P. 193–278.
2. G. Mancia et al. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document // Blood pressure. 2009. V. 18. №. 6. P. 308–347.
3. Prospective Studies Collaboration et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies // The Lancet. 2002. V. 360. №. 9349. P. 1903–1913.
4. И.Е. Чазова, Л.Г. Ратова. Комбинированная терапия у пациентов с артериальной гипертонией // Системные гипертензии. 2010. Т. 2. С. 6–10.
5. Ю.Н. Беленков, Р.Г. Оганов. Кардиология: нац. рук. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 1232 с.
6. Ю.Н. Беленков, В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента в лечении сердечно-сосудистых заболеваний (Квинаприл и эндотелиальная дисфункция). – М.: Инсайт полиграфик, 2002. 86 с.
7. M. Regulski et al. Chemistry and pharmacology of angiotensin-converting enzyme inhibitors // Current pharmaceutical design. 2015. V. 21. № 13. P. 1764–1775.
8. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 26.12.2015 № 2724-р.
9. R. Thomsen et al. In vitro drug metabolism by human carboxylesterase 1: focus on angiotensin-converting enzyme inhibitors // Drug Metabolism and Disposition. 2014. V. 42. № 1. P. 126–133.
10. S. Casey Laizure et al. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? // Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 2013. V. 33. № 2. P. 210–222.
11. Y. Yang et al. Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs // Acta Pharmaceutica Sinica B. 2011. V. 1. № 3. P. 143–159.
12. V.K. Holenarsipur et al. Absorption and cleavage of enalapril, a carboxyl ester prodrug, in the rat intestine: in vitro, in situ intestinal perfusion and portal vein cannulation models // Biopharmaceutics & drug disposition. 2015. V. 36. № 6. P. 385–397.
13. J.C. Sanford et al. Regulatory effects of genomic translocations at the human carboxylesterase-1 (CES1) gene locus // Pharmacogenetics and genomics. 2016. V. 26. № 5. P. 197–207.
14. X. Wang et al. CES1 genetic variation affects the activation of angiotensin-converting enzyme inhibitors // The pharmacogenomics journal. 2015. V. 16. № 3. P. 220–230.
15. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. / Под. ред. проф. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2013. 328 с.
16. Т.А. Родина, Е.С. Мельников, А.В. Соколов, А.Б. Прокофьев, В.В. Архипов, А.А. Аксёнов, Д.Л. Поздняков. Экспресс-методика определения карбамазепина и карбамазепин-10,11-эпоксида методом ВЭЖХ-МС/МС // Химико-фармацевтический журнал. 2016. Т. 50. № 6. С. 52–56.
17. Т.А. Родина, Е.С. Мельников, А.В. Соколов, С.А. Белков, Г.В. Раменская. Определение эналаприла и его активного метаболита эналаприлата в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС при персонализации фармакотерапии больных артериальной гипертензией // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78. № 10. С. 15–20.

УДК 615.03

1 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

2 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, Москва, Научный проезд, 20, стр. 3

1 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – Center of Pharmaceutical Analytics Ltd, 20, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: igorshohin@yandex.ru

РАЗРАБОТКА, ВАЛИДАЦИЯ И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИ-Xa- И АНТИ-IIa-АКТИВНОСТИ ЭНОКСАПАРИНА НАТРИЯ

Б.Ю. Маргаева[1], И.Е. Шохин[2]*

Резюме. Проведена разработка и валидация методик определения анти-Xa- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия в условиях *in vitro* (лекарственные препараты) и *in vivo* (плазма крови) методом УФ-спектрофотометрии. Методики были апробированы на образцах лекарственных средств эноксапарина натрия и плазмы крови кроликов. Показано, что методики пригодны для решения поставленных аналитических задач, в том числе стандартизации лекарственных средств эноксапарина натрия.

Ключевые слова: эноксапарин натрия, анти-Xa, анти-IIa, валидация, стандартизация.

DEVELOPMENT, VALIDATION AND APPLICATION OF ANTI-Xa- AND ANTI-IIa-ENOXAPARINE SODIUM ASSAY

B.Yu. Margaeva[1], I.E. Shohin[2]*

Abstract. Development, validation and application of *in vitro* (dosage forms) and *in vivo* (blood plasma) anti-Xa and anti-IIa enoxaparine sodium assay by UV-spectrophotometer. Assay methods were applied for enoxaparine sodium dosage forms and rabbit plasma samples. It was shown that assay methods are suitable for these analytical purposes including standardization of enoxaparine sodium preparations.

Keywords: enoxaparine sodium, anti-Xa, anti-IIa, validation, standardization.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных задач здравоохранения РФ является своевременное обеспечение производства и надлежащей оценки эффективности и безопасности лекарственных препаратов, входящих в список стратегически значимых ЛП в соответствии со Стратегией «Фарма-2020». В их число входят и препараты-биоаналоги низкомолекулярного гепарина (НМГ), а именно эноксапарина натрия, который широко применяется в клинической практике и производство которого должно быть налажено в стране в рамках государственного проекта [1]. Для стандартизации препаратов-биоаналогов эноксапарина натрия рекомендуется проводить сравнительную оценку активности (антифакторная активность к факторам свертывания крови II и X: анти-Xa и анти-IIa) и фармакокинетики в условиях *in vitro* и *in vivo* относительно препарата сравнения, в качестве которого, как правило, используется оригинальный препарат – Клексан® [2]. В случае подтверждения сопоставимой активности исследуемого и оригинального препарата эноксапарина натрия возможно сделать предположение об их взаимозаменяемости и биоаналогичности [3]. Следует отметить, что количественное определение низкомолекулярных гепаринов, в том числе эноксапарина натрия в сложных матрицах, таких как плазма крови, затруднено из-за неоднородности соединения, молекулярной массы и распределения в ней заряда дисперсии [4], в связи с чем оценку фармакокинетики таких ЛС проводят косвенно, на основании антифакторной активности.

На основании анализа литературных данных определение НМГ рекомендуется проводить коагулометрическим или хромогенным методом [4]. Следует отметить, что коагулометрические методики требуют использования специализированного оборудования – коагулометры, которые обычно не представлены в аналитических лабораториях. В Фармакопее США (USP 38-NF 33) и Европейской Фармакопее (Ph.Eur. 8.4) приведены общие подходы к определению антифакторной активности НМГ в препаратах, но не в биологических жидкостях [5, 6]. В публикациях по определению анти-Xa- и анти-IIa-активности НМГ,

в том числе эноксапарина натрия, не приведены валидационные характеристики методик [7, 8], что не позволяет удостовериться в надежности их применения для поставленных аналитических задач. Кроме того, при изучении публикаций по определению анти-Ха- и анти-IIа-активности НМГ в плазме крови было отмечено, что все они относились к плазме крови человека (пациенты либо добровольцы), но не плазме крови кроликов, используемых в качестве тест-систем на этапе доклинических исследований. Согласно рекомендациям Агентства по лекарственным средствам и пищевым продуктам США, Европейского медицинского агентства, а также «Руководству по экспертизе ЛС» для новых биологических матриц необходимо повторно устанавливать валидационные характеристики биоаналитических методик [9–11]. В работе Sanderink с соавт. [12] было отмечено, что определение анти-IIа-активности эноксапарина натрия в плазме крови затруднено в связи с его низкими уровнями, что определяет необходимость разработки более чувствительных методик ее определения.

Таким образом, разработка и валидация аналитических методик, позволяющих проводить определение активности анти-Ха и анти-IIа низкомолекулярных гепаринов в условиях *in vitro* (препараты) и *in vivo* (плазма крови), является важной задачей, необходимой для сравнительной оценки препаратов эноксапарина натрия: разрабатываемого препарата-биоаналога (эноксапарин натрия) и оригинального (Клексан®).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были взяты: исследуемый препарат – препарат-биоаналог «Эноксапарин натрия», раствор для инъекций 10000 анти-Ха российского производства (более подробная информация не может быть приведена в связи с конфиденциальностью данных); референтный препарат – Клексан®, раствор для инъекций 8000 анти-Ха МЕ/0,8 мл производства «САНОФИ-АВЕНТИС ФРАНС», произведено «Санофи Винтроп Индустрия», Франция. Для каждого из исследуемых ЛС использовалось по 6 доступных серий.

Для проведения определения анти-Ха- и анти-IIа-ктивности препаратов НМГ эноксапарина в условиях *in vitro* и *in vivo* было использовано следующее оборудование: микропланшетный ридер Mindray MR-96A, производитель Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.; УФ-спектрофотометр Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis; УФ-спектрофотометр ПЭ-5400УФ, «ПРОМЭКОЛАБ», Санкт-Петербург; pH/мВ-метр pH 330i; pH-метр 728 pH lab, MetrohmAG, термошейкер Biosan PST-60HL для 96-луночных планшетов; термошейкер Biosan TS-100C для пробирок Эппендорфа, вортекс-шейкер Heidolph, Reaxtop; дозаторы одноканальные переменного объема «Ленпипет Лайт» 10–100 мкл, 100–1000 мкл, 1–10 мл; дозаторы восьмиканальные переменного объема «Ленпипет Лайт» – 5–50 мл и 30–300 мкл.

В работе использовали следующие реактивы и материалы: вода деионизированная; уксусная кислота ледяная (Scharlau, Испания, х.ч.), натрия хлорид (х.ч.), реагенты для определения анти-Ха- и анти-IIа-активности НМГ в условиях *in vitro* (состав: антитромбин III (1 IU/фл), лиофильно высушенный – 3 флакона; фактор Ха (15 нкат/фл), лиофильно высушенный – 1 флакон; тромбин (фактор IIа) (20 NIH/фл), лиофильно высушенный – 1 флакон; хромогенный субстрат для фактора Ха, лиофильно высушенный (2,0 мл) – 2 флакона; хромогенный субстрат для тромбина, лиофильно высушенный (2,0 мл) – 2 флакона; рабочий стандартный образец НМГ – 1 флакон; концентрат буфера (5 мл) – 1 флакон; бычий сывороточный альбумин (1 г) – 1 флакон), реагенты для определения анти-Ха-активности гепарина оптическим методом «Реахром Гепарин» (НПО «Ренам», Россия); реагенты для определения анти-Ха- и анти-IIа-активности гепарина оптическим методом «ACTICHROME® Heparin (anti-IIa)».

В качестве интактной матрицы использовалась пулированная нормальная плазма (не содержащая гепарин, собрана от 20 доноров в возрасте 20–40 лет, стабилизирована HEPES-цитратным буфером, лиофильно высушенная), а также интактная матрица крови кроликов.

В качестве стандартных и калибровочных образов использовали плазму-калибратор для определения анти-Ха-активности гепарина (НПО «Ренам», Россия); контрольную плазму для определения анти-Ха-активности гепарина (НПО «Ренам», Россия); эноксапарин-натрия, стандарт USP RS; пулированная нормальная плазма, набор плазм-калибраторов для определения анти-Ха-активности гепарина; набор плазм контрольных для определения анти-Ха-активности гепарина. Все вышеуказанные плазмы крови были собраны от 20 доноров в возрасте 20–40 лет, стабилизированы HEPES-цитратным буфером, лиофильно высушены, не содержали гепарина. Кроме того, нами были использованы интактные плазмы крови кроликов-самцов породы шиншилла массой 2–4 кг.

Для определения анти-Ха- и анти-IIа-активности использовались следующие растворы реактивов: рабочий буферный раствор, уксусной кислоты 70% раствор, раствор антитромбина III для определения анти-Ха-активности, раствор антитромбина III для определения анти-IIа-активности, раствор фактора Ха, раствор тромбина, раствор хромогенного субстрата для фактора Ха, раствор хромогенного субстрата для тромбина, раствор рабочего стандартного образца НМГ. HEPES-цитратный буферный раствор с pH 7,4 готовили из концентрированного буфера, входящего в состав набора реактивов «Ренапарин-тест», путем разведения 1:20 водой очищенной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение анти-Ха- и анти-IIа-активности эноксапарина натрия в условиях in vitro

Готовили серию разведений рабочего стандартного образца НМГ и серию разведений испытуемого препарата НМГ перед проведением анализа. Определения проводили в полистирольных планшетах, помещая их в термошейкер при 37 °С. Ход анализа определения анти-Ха-активности проходил по схеме, представленной в таблицах 1 и 2.

Таблица 1.

Схема распределения буферного раствора (В), разведения стандартного образца НМГ гепарина (S1 – S5), образца испытуемого препарата (Т1 – Т4) и референтного препарата (R1-R4) в лунках 96-луночного планшета

Ряд	Номер лунки в ряду											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	–	B	S_2	S_4	R_1	R_3	T_1	T_3	–	–	–	–
2	–	B	S_2	S_4	R_1	R_3	T_1	T_3	–	–	–	–
3	–	B	S_2	S_4	R_1	R_3	T_1	T_3	–	–	–	–
4	–	B	S_2	S_4	R_1	R_3	T_1	T_3	–	–	–	–
5	–	S_1	S_3	S_5	R_2	R_4	T_2	T_4	–	–	–	–
6	–	S_1	S_3	S_5	R_2	R_4	T_2	T_4	–	–	–	–
7	–	S_1	S_3	S_5	R_2	R_4	T_2	T_4	–	–	–	–
8	–	S_1	S_3	S_5	R_2	R_4	T_2	T_4	–	–	–	–

Примечание: «–» – незадействованная лунка планшета.

Таблица 2.

Порядок внесения реактивов в лунки планшета

Раствор антитромбина III для определения анти-Ха-активности	20 мкл
Образец препарата или стандарта	20 мкл
Раствор фактора Ха	40 мкл
Инкубация при 37С и перемешивании 2 мин	
Раствор хромогенного субстрата для фактора Ха	100 мкл
Инкубация при 37С и перемешивании 4 мин	
Уксусная кислота	40 мкл

Ход анализа определения анти-IIа-активности проходил по схеме, представленной в таблицах 3 и 4.

Далее измеряли оптическую плотность растворов при 405 нм с помощью микропланшетного ридера Mindray MR-96A. Выбор аналитической длины волны был обусловлен тем, что при данной длине волны наблюдалось максимальное светопоглощение и специфичность определения, что связано со структурой и цветом продукта реакции фактора Ха или IIа с хромогенным субстратом (*пара*-нитроаналин, максимум поглощения при 405 нм).

Таблица 3.

Схема распределения буферного раствора (В), разведения стандартного образца НМГ гепарина (S2 – S6) , образца испытуемого препарата (Т1 – Т4) и референтного препарата (R1-R4) в лунках 96-луночного планшета

Ряд	Номер лунки в ряду											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	–	B	S3	S5	R1	R3	T1	T3	–	–	–	–
2	–	B	S3	S5	R1	R3	T1	T3	–	–	–	–
3	–	B	S3	S5	R1	R3	T1	T3	–	–	–	–
4	–	B	S3	S5	R1	R3	T1	T3	–	–	–	–
5	–	S2	S4	S6	R2	R4	T2	T4	–	–	–	–
6	–	S2	S4	S6	R2	R4	T2	T4	–	–	–	–
7	–	S2	S4	S6	R2	R4	T2	T4	–	–	–	–
8	–	S2	S4	S6	R2	R4	T2	T4	–	–	–	–

Таблица 4.

Порядок внесения реактивов

Раствор антитромбина III для определения анти-IIа-активности	20 мкл
Образец препарата или стандарта	20 мкл
Раствор фактора IIа	40 мкл
Инкубация при 37С и перемешивании 2 мин	
Раствор хромогенного субстрата для фактора IIа	100 мкл
Инкубация при 37С и перемешивании 4 минуты	
70% раствор кислоты уксусной	40 мкл

Определение анти-Ха- и анти-IIа-активности эноксапарина натрия в условиях in vitro

Пробоподготовка образцов плазмы крови к анализу проводилась путем их разведения в буферном растворе с pH 7,4, приготовленном как описано ранее. Анализ проводили в полистирольном планшете при 37 °С. С помощью одноканального дозатора в две лунки 1-Fи 1-H ряда планшета вносили по 200 мкл рабочего буферного раствора (раствор сравнения). Далее с помощью многоканального дозатора приготовленные рабочие растворы вносили в полистирольные планшеты по следующей схеме, представленной в таблицах 5 и 6.

Таблица 5.

Ход анализа

Вносили в лунки:	Образец	Бланк
Рабочий раствор фактора Xa или IIa	40 мкл	---
Раствор 2	40 мкл	---
Рабочий буферный раствор	---	200 мкл
Инкубировали при 37 °С точно 5 минут		
Раствор хромогенного субстрата	40 мкл	---
Инкубировали при 37 °С точно 5 мин		
70% раствор уксусной кислоты	80 мкл	---

Измеряли оптическую плотность образца на планшетном спектрофотометре при длине волны 405 нм и по калибровочному графику рассчитывали анти-Xa-активности эноксапарина натрия.

Аналогичным образом проводили исследования анти-IIa-факторной активности эноксапарина натрия при использовании соответствующих реактивов и раствора фактора свертывания IIa с целью оценки анти-IIa-активности эноксапарина натрия.

Кроме того, разработанная методика была модифицирована для использования на кюветном УФ-спектрофотометре, поскольку объемы исследуемого образца (200 мкл) недостаточны для внесения в классическую кювету шириной 10 см. Для этого все объемы вносимых образцов реактивов были пропорционально увеличены в 5 раз по сравнению с методикой для планшетного спектрофотометра, при этом инкубирование образцов проводилось в пробирках Эппендорфа вместимостью 2 мл в соответствующем термошейкере.

Валидация методики

Валидацию методик определения анти-IIa- и анти-Xa-активности эноксапарина натрия в препаратах и плазме крови кроликов проводили согласно ГФ XIII ОФС «Валидация аналитических методик» по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (на двух уровнях: сходимость, промежуточная прецизионность), аналитический диапазон.

Для методик определения анти-IIa- и анти-Xa-активности в плазме крови кроликов валидация проводилась как для методики в модификации как для планшетного, так и кюветного УФ-спектрофотометра.

Специфичность. Для оценки специфичности методики определения активности анти-IIa- и анти-Xa-активности эноксапарина натрия в препаратах (*in vitro*) и плазме крови кроликов (*in vivo*) для каждой из методик проводили определение активности для холостого образца (для определения анти-IIa- и анти-Xa-активности эноксапарина натрия в препаратах в качестве холостого образца использовали воду очищенную). Для определения для анти-IIa- и анти-Xa-активности эноксапарина натрия в качестве холостого образца использовали интактную плазму кроликов от 6 разных животных, а также интактную плазму крови человека и рассчитывали в каждом из случаев сигнал УФ-СФМ для данного образца.

Для каждой из разработанных методик отклик сигнала для холостого образца как для плазмы крови человека, так и плазмы крови кроликов, уровень анти-IIa- и анти-Xa-активности эноксапарина натрия не отличался от нуля. Таким образом, было показано, что при использовании разных биологических матриц (плазма крови человека или кроликов) сохраняется специфичность разработанной методики.

Таблица 6.

Схема внесения образцов в лунки планшета

Ряд	Номер лунки в ряду											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Контроль 1	….	….	….	….	….	….	….	….	….	X	Бланк
B	Контроль 2	….	….	….	….	….	….	….	….	….	X	Бланк
C	Калибровка 0	….	….	….	….	….	….	….	….	….	X	X
D	Калибровка 1	….	….	….	….	….	….	….	….	….	X	X
E	Калибровка 2	….	….	….	….	….	….	….	….	….	X	X
F	X	….	….	….	….	….	….	….	….	….	X	X
G	X	….	….	….	….	….	….	….	….	….	X	X
H	X	….	….	….	….	….	….	….	….	….	X	X

Примечание: X – пустая лунка;
«…» – образцы исследуемой плазмы кроликов.

Линейность

Определение анти-Ха-активности эноксапарина натрия in vitro

Готовили 5 образцов стандартных растворов эноксапарина натрия с активностью 0,212 МЕ/мл, 0,141 МЕ/мл, 0,094 МЕ/мл, 0,0628 МЕ/мл, 0,0418 МЕ/мл. Для построения калибровочных кривых использовали линейную регрессию с нормированием 1/x. Проводили линию тренда в диапазоне активности 0,2–0,04 МЕ/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график (рисунок 1) совместно с уравнением калибровочной кривой. Коэффициент корреляции составил 0,98 для этого и последующих определений. Во всех случаях была отмечена обратная пропорциональная зависимость активности эноксапарина натрия от оптической плотности образца. Рекомендуемые координаты калибровочных графиков были приведены в информационных материалах к реактивам и различались для оценки анти-IIa- и анти-Ха-активности.

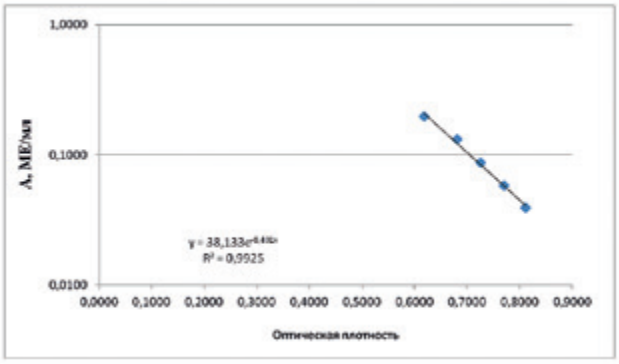


Рисунок 1. Калибровочный график для определения анти-Ха-активности препарата

Определение анти-IIa-активности эноксапарина натрия in vitro. Проводили измерение оптической плотности 5 образцов стандартных растворов эноксапарина натрия с активностью 0,041 МЕ/мл, 0,0277 МЕ/мл, 0,0184 МЕ/мл, 0,0123 МЕ/мл, 0,0082 МЕ/мл.

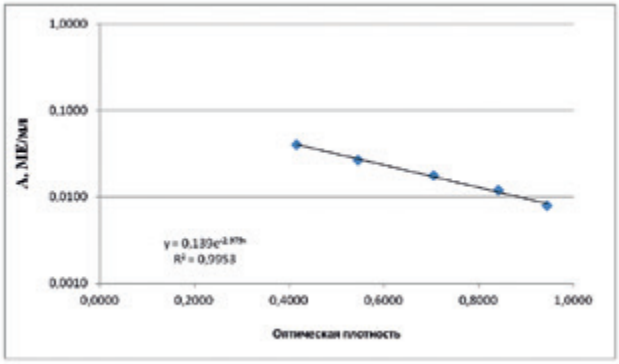


Рисунок 2. Калибровочный график для определения анти-IIa-активности препарата

Определение анти-Ха-активности эноксапарина натрия in vivo. Проводили измерение оптической плотности 3 стандартных растворов эноксапарина натрия с активностью 0,00 МЕ/мл, 0,48 МЕ/мл, 0,93 МЕ/мл.

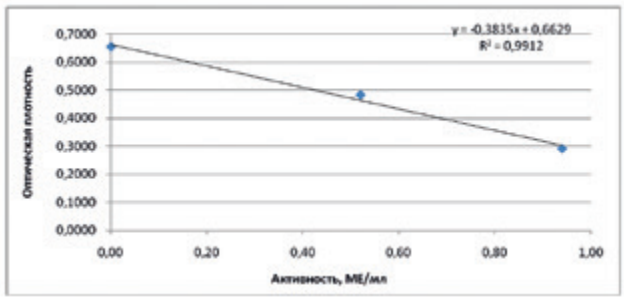


Рисунок 3. Калибровочный график зависимости оптической плотности эноксапарина от его активности (анти-Ха)

Определение анти-IIa-активности эноксапарина натрия in vivo. Проводили измерение оптической плотности 4 образцов стандартных растворов эноксапарина натрия с активностью 0,000 МЕ/мл, 0,0150 МЕ/мл, 0,300 МЕ/мл, 0,600 МЕ/мл.

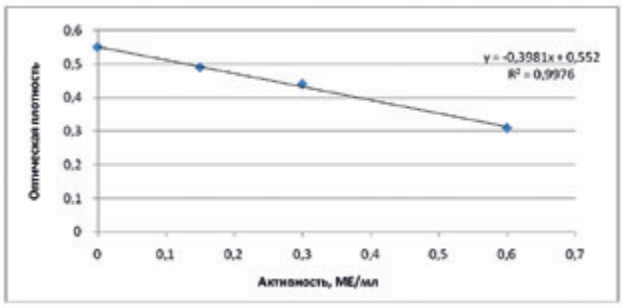


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости оптической плотности эноксапарина от его активности (анти-IIa)

Правильность и прецизионность

*Определение анти-Ха- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия in vitro***.** Проводили анализ 3 образцов активности стандартных растворов эноксапарана натрия 0,212 МЕ/мл, 0,0940 МЕ/мл, 0,0418 МЕ/мл для определения *анти-Ха- и* 0,0410 МЕ/мл, 0,0184 МЕ/мл, 0,0082 МЕ/мл для определения *анти-IIa-активностей*. Каждый раствор измеряли на спектрофотометре 3 раза. Исследование проводили в двух последовательностях, с участием двух разных аналитиков. Для полученных значений анти-Ха-активности концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (S.D. inter-day: 0,0103; 0,0072; 0,0035, intra-day: 0,0192; 0,0066; 0,0041), относительного стандартного отклонения (RSD, %, inter-day: 5,24; 7,67; 7,57; intra-day: 9,33; 7,06; 9,48) и относительной погрешнос-

ти (ε, % inter-day: 7,70; 0,00; 10,45; intra-day: 2,91; 0,74; 3,27). Для полученных значений анти-IIa-активности концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (S.D. inter-day: 0,0024; 0,0018; 0,0008, intra-day: 0,0023; 0,0014; 0,0007), относительного стандартного отклонения (RSD, % inter-day: 6,07; 9,91; 9,30; intra-day: 5,84; 7,54; 7,82) и относительной погрешности (ε, % inter-day: 3,41; 0,36; 2,44; intra-day: 2,44; 0,45; 2,24).

Определение анти-Ха- и анти-IIa-активностей эноксапарина натрия in vivo. Проводили анализ 3 образцов активности стандартных растворов эноксараина натрия 0,00 МЕ/мл, 0,48 МЕ/мл, 0,93 МЕ/мл для определения *анти-Ха-* и 0,150МЕ/мл, 0,300МЕ/мл, 0,600МЕ/мл для опредедения *анти-IIa-активности*. Каждый раствор измеряли на спектрофотометре 3 раза. Исследование проводили в двух последовательностях, с участием двух разных аналитиков. Для полученных значений анти-Ха-активности концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (S.D. inter-day: 0,00; 0,04; 0,07, intra-day: 0,00; 0,05; 0,06), относительного стандартного отклонения (RSD, % inter-day: 0,00; 7,21; 7,24; intra-day: 0,00; 9,40; 6,07) и относительной погрешности (ε, % inter-day 0,00; 4,17; 2,87; intra-day: 0,00; 2,08; 2,15). Для полученных значений анти-IIa-активности концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (S.D. inter-day: 0,015; 0,011; 0,015, intra-day: 0,014; 0,009; 0,018), относительного стандартного отклонения (RSD, % inter-day: 9,96; 3,45; 2,50; intra-day: 9,43; 2,97; 2,92) и относительной погрешности (ε, % inter-day: 2,22; 1,56; 0,28; intra-day: 0,00; 1,25; 0,53). Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) не превышали 10,00% (максимально допустимое отклонение, приведенное в инструкциях по применению наборов для нализа анти-Ха- и анти-Ха-активности).

Таким образом, по результатам валидации методик определения анти-Ха- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия в препаратах и плазме крови кроликов было показано, что разработанные методики пригодны для указанных аналитических задач.

Апробация методики определения анти-Ха- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия в условиях in vitro

В ходе количественного определения анти-Ха- и анти-IIa-активности препаратов эноксапарина натрия по разработанной методике были получены величины анти-Ха- и анти-IIa-активности для исследуемого и референтного препаратов, соответствующие нормам отношения активностей по USP (таблица 7). Кроме того, было показано, что при анализе различных серий исследуемого и референтного препаратов данные соотношения не меняются от серии к серии. Таким образом, было установлено, что исследуемый разрабатываемый препарат «Эноксапарин натрия» обладает межсерийной однородностью по величинам анти-Ха- и анти-IIa-активности *in vitro,* а также их соотношению (RSD не более 5%).

Апробация методики определения анти-Ха- и анти-IIa-активности эноксапарина натрия в условиях in vivo

Определение антифакторной активности эноксапарина натрия (для оригинального и воспроизведенного препаратов) в условиях *in vivo* (доклиническое

Таблица 7.

Результаты определения анти-Ха- и анти-IIa-активности исследуемых препаратов

серия №	Эноксапарин натрия, активность			Клексан®, активность		
	анти-Ха	анти-IIa	соотношение	анти-Ха	анти-IIa	соотношение
1	10 480	2 840	3,69	10 264	2 668	3,85
2	10 077	2 590	3,89	10 297	2 565	4,01
3	10 527	2 680	3,93	10 672	2 759	3,87
4	9 834	2 660	3,70	10 843	2 735	3,96
5	10 665	2 788	3,83	10 634	2 760	3,85
6	10 319	2 493	4,14	10 225	2 631	3,89
Ср.знач.	10 317	2 675	3,86	10 489	2 686	3,91
RSD,%	3,01	4,75	4,32	2,48	2,94	1,68

исследование) проходило в два этапа: биологический и аналитический. Биологический этап исследования проводился на 8 кроликах-самцах породы шиншилла. Забор венозной крови для определения концентрации исследуемых препаратов производили у экспериментальных животных из ушной вены: до введения препаратов, через 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 24 ч. Анализ образцов проводился по приведенной выше методике.

По результатам фармакокинетических исследований как для анти-Ха-, так и для анти-IIа-активности препарата-биоаналога эноксопарина натрия было установлено, что характер фармакокинетических кривых, полученных после введения препаратов эноксапарин натрия (Т) и Клексан (R), в целом сходен, причем индивидуальная вариабельность значений активностей эноксапарина натрия в обоих случаях примерно одинакова. Эквивалентность фармакокинетических профилей препаратов Т и R была подтверждена при помощи математических методов (f, f', f''), которые укладывались в допустимый интервал (80,00–125,00%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

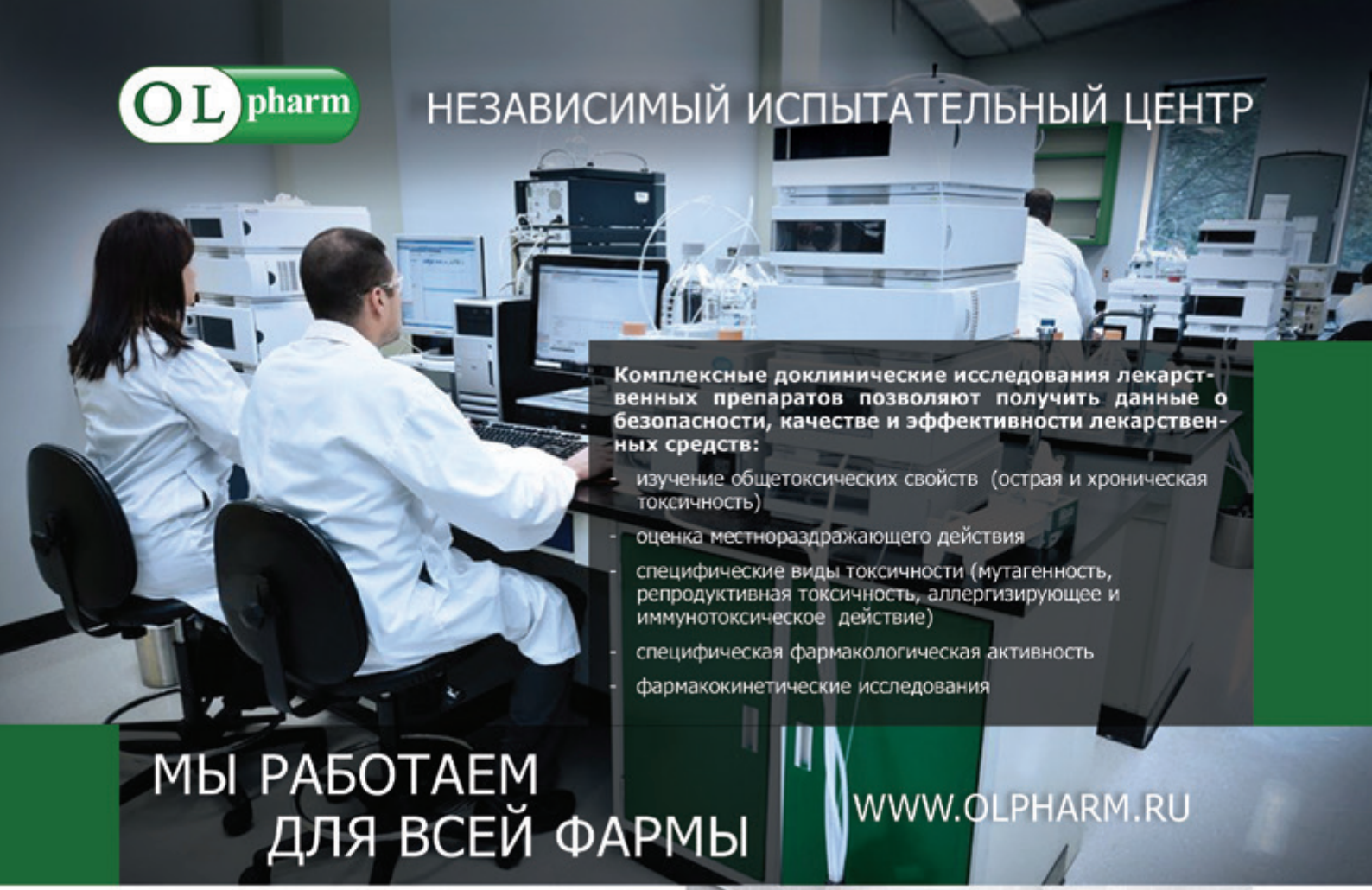
1. Были разработаны методики определения анти-Ха- и анти-IIа-активностей эноксапарина натрия в условиях *in vitro* и *in vivo* методами УФ-спектрофотометрии и планшетной УФ-спектрофотометрии, установлены их основные валидационные характеристики согласно ГФ 13. Показано, что разработанные методики могут быть использованы для указанных аналитических задач.
2. Проведена апробация разработанной методики для сравнительного исследования активности выбранных препаратов-биоаналогов в условиях *in vitro*. Установлено, что соотношение активностей анти-Ха и анти-IIа для исследуемых препаратов является сопоставимым.
3. Осуществлена апробация разработанной методики для сравнительного исследования активности выбранных препаратов-биоаналогов в условиях *in vivo*. Было определено, что фармакокинетика исследуемых ЛС является эквивалентной. На основании результатов сравнительных исследований *in vitro* и *in vivo* показана биоаналогичность исследуемых ЛС на доклиническом этапе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации. Утвержден распоряжением Правительства Российской Федерации от 6 июля 2010 г. № 1141-р, г. Москва.
2. Б.Ю. Маргаева. Подходы к оценке взаимозаменяемости биоаналогов (биосимиляров) на стадии их государственной регистрации в свете реализации стратегии «Фарма-2020» (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 3(4). С. 88–93.
3. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1). EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2012. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/05/WC500127960.pdf (дата обращения 30.09.2016).
4. А.Л. Бекровский, Е.В. Сергеева, А.В. Суворов, А.А. Козлов. Методическое руководство. Методы определения активности гепарина. – М.: Ренам, 2011. С. 3.
5. European Pharmacopoeia 8.0.
6. United States Pharmacopoeia. – National Formulary 38–33.
7. Т.А. Ярушок, Б.Ю. Маргаева, И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, А.Ю. Савченко. Определение анти-Ха- и анти-IIа-активности препаратов низкомолекулярного гепарина (эноксапарина натрия) с использованием готовых наборов «Ренапарин-тест» методом с хромогенными субстратами // Биофармацевтический журнал. 2015. Т. 7. № 1. С. 47–52.
8. Т.А. Ярушок, Б.Ю. Маргаева, И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, А.Ю. Савченко. Доклинические фармакокинетические исследований препаратов-биоаналогов эноксапарина натрия // Биофармацевтический журнал. 2015. Т. 7. № 1. С. 56–60.
9. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. – М.: Гриф и К., 2013. 328 с.
10. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2013.
11. Guideline on bioanalytical method validation (European medicines agency). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). – London. 2011.
12. G.J. Sanderink, C.G. Guimart, M.L. Ozoux, N.U. Jariwala, U.A. Shukla, B. X. Boutouyrie. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the prophylactic dose of enoxaparin once daily over 4 days in patients with renal impairment // Thrombosis Research. 2002. № 105. P. 225–231.

OL pharm

НЕЗАВИСИМЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР



Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

WWW.OLPHARM.RU

Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри

Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10 от 08.10.2014

Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09 от 30.04.2009 на выполнение работ с микроорганизмами 3–4 групп патогенности

ООО «ОЛФАРМ»
117105, Г. МОСКВА,
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU

УДК 615.015.4

1 – ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

2 – ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, 24

1 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – National Research Center Institute of Immunology Federal Medical Biological Agency of Russia, 24, Kashirskoe road, Moscow, 115478, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail:
egorenkov.eugene@gmail.com

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СОВМЕСТНОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТРАТОВ-МАРКЁРОВ ОСНОВНЫХ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА Р450 И ИХ МЕТАБОЛИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ-МС/МС

Е.А. Егоренков[1,2]*, В.В. Смирнов[1,2]

Резюме. Разработана методика совместного количественного определения субстратов – маркёров основных изоферментов цитохрома Р450 и их метаболитов в моче методом ВЭЖХ-МС/МС с целью определения активности следующих изоферментов: кофеин/параксантин для CYP1A2, лозартан/Е-3174 для CYP2C9, кортизол/6-β-гидроксикортизол для CYP3A4 и пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β–карболин для CYP2D6. Карбамазепин использовался как внутренний стандарт. В качестве биообъекта использовалась моча, пробоподготовка образцов проводилась путем экстракции смесью этилацетат : гексан : диэтиловый эфир (50:35:15) с последующей корректировкой pH образца мочи боратным буфером (pH=9,4) и экстракцией смесью этилацетат : гексан (50:50). Методика успешно прошла процедуру валидации и может быть использована для определения активности изоферментов цитохрома Р450 в клинической практике.

Ключевые слова: цитохром Р450, CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, коктейльный метод, фенотипирование, кофеин, лозартан, кортизол, пинолин.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SIMULTANEOUS ASSAY OF SUBSTRATES-MARKERS OF MAIN CYTOCHROME P450 ISOFORMS AND THEIR METABOLITES USING HPLC-MS/MS

E.A. Egorenkov[1,2]*, V.V. Smirnov[1,2]

Abstract. Simultaneous quantification method of assaying main CYP isoforms substrates-markers and their metabolites in urine using HPLC-MS/MS was developed to determine activity of following isoforms: caffeine/paraxanthine for CYP1A2, losartane/E-3174 for CYP2C9, cortisole/6-β-hydroxycortisole for CYP3A4 and pinoline/6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline for CYP2D6. Carbamazepine was used as internal standart. Urine was used as biological object, samples were prepared by extraction with ethyl acetate : hexane : diethyl ether (50:35:15) mixture continued with pH correction of urine sample using borate buffer (pH=9,4) and following extraction with ethyl acetate : hexane mixture (50:50). Method was successfully validated and can be put in clinical practice for CYP isoforms activity determination.

Keywords: Cytochrome P450, CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, «cocktail» method, phenotyping, caffeine, losartane, cortisole, pinoline.

ВВЕДЕНИЕ

Практически любая фармакотерапия (в особенности полиграмазия) сопровождается риском возникновения нежелательных лекарственных явлений. В основе механизмов развития нежелательных лекарственных реакций лежит множество факторов, одним из которых является измененная активность ферментов метаболизма, в частности системы цитохрома Р450, отвечающей за 75% от общего числа метаболических превращений в организме [1]. Система цитохрома Р450 (в литературе обозначаемая CYP) включает в себя множество изоферментов, каждый из которых выполняет свою отдельную функцию в процессах биотрансформации и имеет специфический субстрат [2]. Для определения активности CYP широко применяется метод фенотипирования, основанный на определении активности метаболизма по отношению концентраций вещества-субстрата конкретного изофермента и его метаболита в биожидкостях организма [3]. Существует множество методик определения активности отдельных изоферментов CYP, однако, узнав о состоянии активности только одного изофермента, невозможно получить полные сведения об активности системы метаболизма в целом. Поэтому в последнее время набирают популярность «коктейльные» методы фенотипирования, позволяющие определить активность нескольких изоферментов CYP в одной пробе [4]. После

изучения описанных в литературе «коктейльных» методов фенотипирования CYP [5] авторами были учтены основные недостатки представленных методов (использование потенциально опасных лекарственных веществ в качестве маркёров; использование венозной крови в качестве биообъекта, что повышает инвазивность метода; игнорирование возможности использования эндогенных субстратов), в результате чего был предложен новый состав «коктейля» для определения активности метаболизма, а также разработана методика совместного количественного определения субстратов-маркёров и их метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве субстратов-маркёров для определения активности изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 и CYP2D6 использовались следующие вещества (приведены в паре с метаболитами): кофеин/параксантин, лозартан/E-3174, кортизол/6-β-гидроксикортизол и пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин соответственно. Кортизол, 6-β-гидроксикортизол, пинолин и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин являются эндогенными веществами и всегда присутствуют в биожидкостях организма. Карбамазепин использовался в качестве внутреннего стандарта. Биологическая матрица – интактная моча, очищенная от эндогенных аналитов путём проведения двухкратной экстракции согласно разработанной методике пробоподготовки. Пробоподготовка проводилась методом жидкостной экстракции. Калибровочные образцы готовились с использованием интактной плазмы в соответствии с таблицей 1.

К 1 мл образца мочи, помещенному в стеклянную пробирку для экстракции объемом 4 мл, прибавляли стандартный раствор ВС (до концентрации 10 нг/мл), встряхивали смесь на вихреобразной мешалке типа «вортекс» в течение 5 секунд, после чего в пробирку прибавляли 2 мл смеси этилацетат : гексан : диэтиловый эфир (50:35:15), после чего пробирку помещали в вихревую мешалку и экстрагировали в течение 10 минут. После процедуры экстракции органический слой отделяли и помещали в чистую пробирку для экстракции объемом 4 мл. К оставшейся водной фазе добавляли 0,5 мл боратного буфера (pH=9,4), 2 мл смеси этилацетат : гексан (50:50), после чего проводили процедуру экстракции на вихревой мешалке в течение 10 минут. После экстракции органический слой отделяли и объединяли с органическим слоем, полученным после первого этапа экстракции. Объединенный органический слой упаривали в вакуумно-роторном испарителе, после чего сухой остаток перерастворяли в 100 мкл метанола, затем полученный раствор переливали в виалу для хроматографирования и помещали в автосемплер хроматографа.

Хроматографический анализ проводился на системе ВЭЖХ-МС/МС, состоящей из жидкостного хроматографа Agilent 1260 (Agilent Technologies, США), оснащенного тандемным масс-спектрометрическим детектором Agilent 6400 QQQ (Agilent Technologies, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате были подобраны хроматографические условия, представленные в таблице 2.

Количественное определение проводилось методом внутреннего стандарта. Для построения калибровочных графиков использовались калибро-

Таблица 1.

Концентрация аналитов в калибровочных образцах

№ пробы	Концентрация аналита, нг/мл								
	Кофеин	Параксантин	Лозартан	EXP-3174	Кортизол	6-β-OH-кортизол	Пинолин	Метаболит пинолина	Карбамазепин (ВС)
1	10	10	10	10	10	10	0,5	0,5	10
2	25	25	25	25	25	25	0,75	0,75	10
3	50	50	50	50	50	50	1	1	10
4	100	100	100	100	100	100	1,5	1,5	10
5	250	250	250	250	250	250	2	2	10
6	500	500	500	500	500	500	2,5	2,5	10
7	1000	1000	1000	1000	1000	1000	5	5	10
8	2500	2500	2500	2500	2500	2500	7,5	7,5	10
9	5000	5000	5000	5000	5000	5000	10	10	10

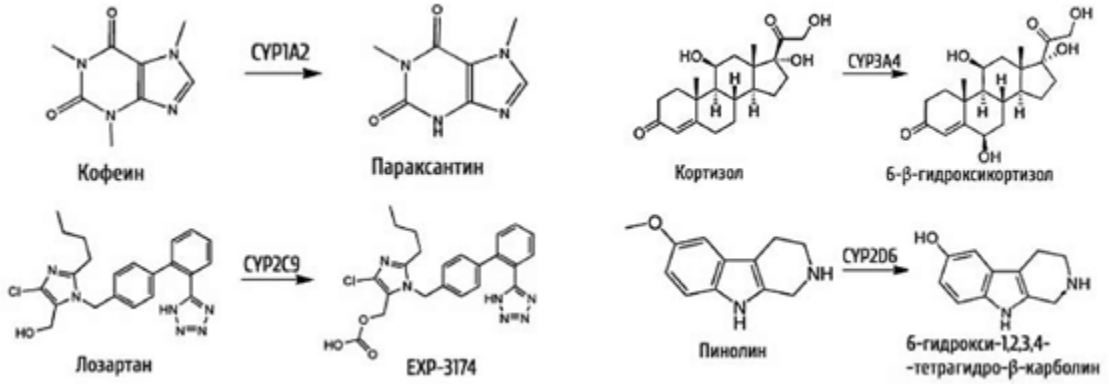


Рисунок 1. **Химические формулы анализируемых субстратов-маркёров и их метаболитов (приведены в виде реакций с участвующими в них изоферментами)**

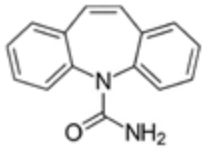


Рисунок 2. **Химическая формула внутреннего стандарта карбамазепина**

вочные образцы, приготовленные в соответствии с таблицей 1. После хроматографирования калибровочных образцов по полученным данным строились калибровочные графики зависимости отношения площади пика аналита к площади пика ВС от концентрации аналита.

Жидкостной хроматограф Agilent Technologies 1290

Масс-спектрометрический детектор Agilent Technologies 6400 QQQ

Таблица 2.

Хроматографические параметры и параметры детектирования разработанной методики

<table>
<tr><td>Хроматограф</td><td>Agilent 1290 Infinity</td></tr>
<tr><td>Колонка</td><td>Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1×50 мм, 1,8 мкм</td></tr>
<tr><td>Температура колонки</td><td>50 °С</td></tr>
<tr><td>Подвижная фаза</td><td>Компонент А: раствор 5 мМ аммония формиата в 0,01% растворе муравьиной кислоты в воде
Компонент В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле</td></tr>
<tr><td>Скорость потока подвижной фазы</td><td>0,4 мл/мин</td></tr>
<tr><td>Элюирование</td><td>Градиентное
<table>
<tr><th>Время, мин</th><th>Компонент А, % (V/V)</th><th>Компонент В, % (V/V)</th></tr>
<tr><td>0</td><td>90</td><td>10</td></tr>
<tr><td>1,5</td><td>90</td><td>10</td></tr>
<tr><td>2</td><td>80</td><td>40</td></tr>
<tr><td>8,5</td><td>30</td><td>70</td></tr>
<tr><td>12</td><td>95</td><td>5</td></tr>
<tr><td>14</td><td>90</td><td>10</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Объем вводимой пробы</td><td>10 мкл</td></tr>
</table>

Ориентировочные времена удерживания, мин	кофеин – около 4,1; параксантин – около 3,0; лозартан – около 7,0; EXP-3174 – около 6,2; кортизол – около 4,9; 6-β-гидроксикортизол – около 4,3; 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – около 1,1; пинолин – около 5,0; карбамазепин – около 7,2
Время анализа	14 мин
Параметры масс-детектирования	Ионизация: ESI Напряжение на капилляре: 3500 В Температура ионной трубки: 350 °С Температура ионизационной камеры: 400 °С Вспомогательный газ: 10 л/мин Газ периферийного слоя: 11 л/мин Сметающий газ: 3 л/мин Давление газа в ячейке соударений: 2,0 мТорр Параметры MRM переходов:

Аналит	Полярность	Ион-прекурсор (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Энергия соударения, В
Кофеин	+	195,0	138,3	30
Параксантин	+	181,0	124,4	30
Лозартан	+	423,2	207,1	34
EXP-3174	+	437,2	235,1	34
Кортизол	–	407,0	331,0	–26
6-β-гидроксикортизол	–	423,0	347,0	–26
Пинолин	+	203,2	147,0	35
6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	+	189,0	117,0	30
Карбамазепин (ВС)	+	237,1	194,0	30

Была проведена валидация методики в соответствии с требованиями «Руководства по экспертизе лекарственных средств» под редакцией проф. А.Н. Миронова, том I, по следующим показателям: селективность, линейность, точность и прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Селективность. Для определения селективности были протестированы 6 образцов биологической матрицы (моча, очищенная от эндогенных исследуемых веществ) на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные компоненты матрицы, метаболиты, продукты разложения). Отсутствие потенциально мешающих веществ принимается, если площади пиков не превышают 20% от значения площади пика стандарта НКПО (нижнего предела количественного определения) определяемых веществ.

Линейность. Линейность зависимости отношения площадей пика исследуемых веществ к площади пика ВС от концентрации исследуемых веществ определялась по 9 ненулевым калибровочным стандартам.

Коэффициент корреляции построенных калибровочных кривых составил более 0,99, что удовлетворяет критериям приемлемости. После построения калибровочной кривой был проведен обратный расчет концентраций используемых стандартов по всем кривым и определены статистические данные. Отклонения нижнего предела количественного определения (НПКО) от теоретической концентрации составили не более 20%, Отклонения всех стандартов, кроме НПКО, от теоретической концентрации – не более 15%, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Таблица 3.

Полученные уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции

Аналит	Диапазон линейности, нг/мл	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент корреляции
Кофеин	10–5000	y=0,0019x-0,0061	0,99612
Параксантин	10–5000	y=0,0017x+0,0004	0,99964
Лозартан	10–5000	y=0,0004x+0,0418	0,99596
Е-3174	10–5000	y=0,0012x+0,1023	0,99712
Кортизол	10–5000	y=0,00004x+0,009	0,99637
6-β-гидроксикортизол	10–5000	y=0,0003x+0,0085	0,99539
Пинолин	0,5–10	y=0,0003x+0,00005	0,99606
6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	0,5–10	y=0,0003x+0,00005	0,99280

Точность и прецизионность

Точность и прецизионность метода внутри одной серии оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества. Каждый образец определялся в 5 повторах. Точность и прецизионность оценивалась как внутри, так и между сериями.

Среднее значение концентрации образца контроля качества не превышало 15% от теоретической величины (для НПКО – 20%), что говорит об удовлетворительной точности методики. Относительное стан-

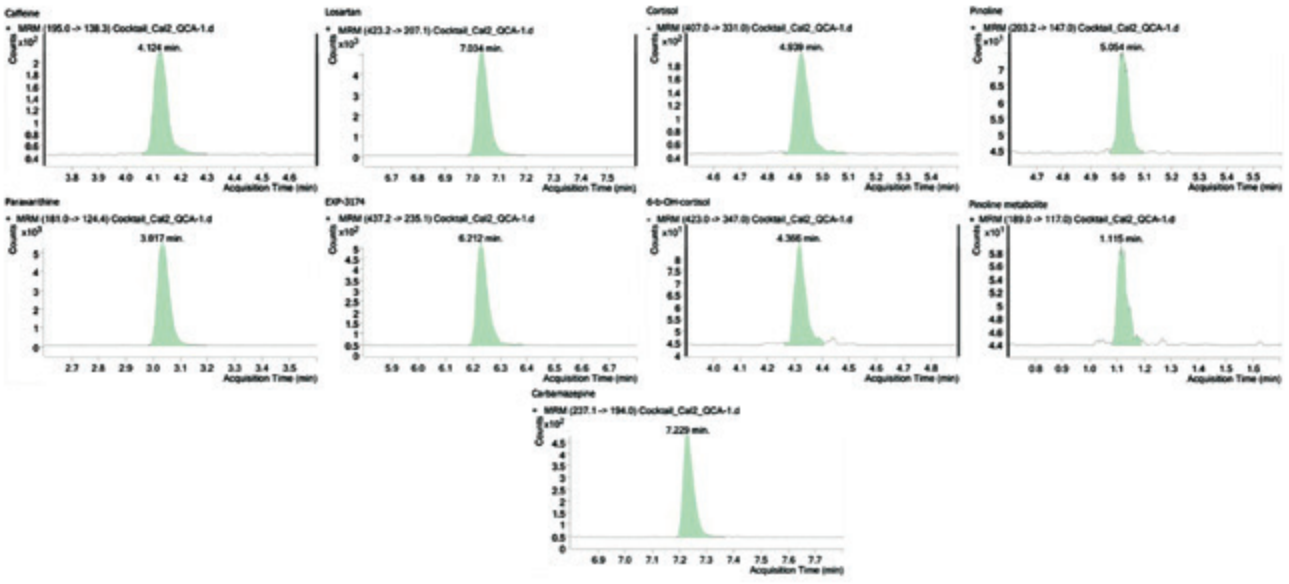


Рисунок 3. Хроматограмма калибровочного образца № 2

дартное отклонение значений концентраций каждого образца контроля качества не превышало 15% (для НПКО – 20%), что говорит об удовлетворительной прецизионности методики.

Методика удовлетворяла прочим критериям приемлимости валидационных параметров согласно «Руководства по экспертизе лекарственных средств» под редакцией проф. А.Н. Миронова, том I, а так же руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» (Май 2011г.), рекомендациями EMEA «Guidelineon validation of bioanalytical method» (Ноябрь 2009 г.), а именно: эффект матрицы (коэффициент вариации воспроизводим и составил не более 15% для образцов контроля качества), степень извлечения (значение коэффициента вариации составило не более 15% для образцов контроля качества), предел количественного определения (предел количественного определения для кофеина, параксантина, лозартана, Е-3174, кортизола и 6-β-гидроксикортизола составил 10 нг/мл, для пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина – 0,5 нг/мл, т.к. для этих концентраций возможно определение аналитов со отклонением среднего значения и значением относительного стандартного отклонения не более 20% в диапазоне линейной зависимости), перенос пробы (отклик пика при последовательном вводе образца контроля качества с высокой концентрацией анализируемых веществ составил не более 20% от НПКО), стабильность при различных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана селективная, точная, чувствительная и воспроизводимая методика совместного количественного определения субстратов – маркёров основных изоферментов цитохрома Р450 и их метаболитов в моче с помощью ВЭЖХ-МС/МС при использовании жидкостной экстракции в качестве пробоподготовки. Была проведена валидация аналитической методики по основным параметрам: селективности, линейности, точности и прецизионности, эффекту матрицы, степени извлечения, пределу количественного определения, переносу пробы, стабильности. Разработанная методика удовлетворяла критериям приемлемости по всем валидационным параметрам.

Разработанная методика может быть использована для определения метаболической активности основных изоферментов цитохрома Р450 в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. F.P. Guengerich. Cytochrome p450 and chemical toxicology // Chemical Research in Toxicology. 2008. V. 21(1). P. 70–83.
2. В.Г. Кукес. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. – М.: Реафарм, 2004. 144 с.
3. P.M. De Kesel et al. Alternative Sampling Strategies for Cytochrome P450 Phenotyping // Clinical Pharmacokinetics. 2016. V. 55(2). P. 169–84.
4. S. Ghassabian et al. Simultaneous in vivo phenotyping of CYP enzymes // Methods in Molecular Biology. 2013. V. 987. P. 261–267.
5. Е.А. Егоренков, В.В. Смирнов. «Коктейльные» методы определения метаболической активности изоферментов цитохрома р-450 *in vivo* с помощью биоаналитических методик: обзор существующих методик и перспектива их использования в клинической практике. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 184–188.

ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЕ ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

CRYSTE Laboratory & Biomedical Technology

Центрифуги CRYSTE с расширенным набором технических возможностей и системой охлаждения от -10°C до +40 °C с набором роторов под пробирки различного объема

Универсальная центрифуга PURISPIN 17R

- разделение жидких систем с высокой скоростью до 17000 об/мин
- сохраняет термочувствительные пробы
- поддерживает основные стандарты работы с микрообъемами: реакции с нуклеиновыми кислотами, ПЦР, субклеточное разделение и т.д.

286 000 руб.

Универсальная центрифуга большой вместимости VARISPIN 15R

- скорость вращения до 15000 об/мин
- поддерживает работу с роторами разного типа

501 000 руб.

Низкоскоростные центрифуги

Универсальная центрифуга VARISPIN 4 с угловым ротором или ротором крестовиной

171 000 руб.

Низкоскоростная центрифуга VARISPIN 4A с угловым ротором

129 000 руб.

Локальные вытяжные системы PURIFUME_ductless

- вытяжное устройство без воздуховода для очистки опасных газов с использованием специальных фильтров с рециркуляцией очищенного воздуха
- удаление частиц размером до 0,3 мкм эффективностью 99,993%

303 000 руб.

PURICUBE бокс биологической безопасности (II класс, тип A2)

- HEPA-фильтр нисходящего потока очищает рециркулирующий воздух: 70% от загрязненного воздуха
- HEPA-фильтр на выходе очищает отработанный воздух: 30% от загрязненного воздуха, фильтрация мельчайших частиц размером 0,3 мкм с эффективностью 99,999%

342 000 руб.

Фильтрация воздуха в лаборатории от CRYSTE - максимальная безопасность для сотрудников предприятия: 3-х уровневая схема позволяет одновременно устранять NH_3, H_2S, HCHF, SO_x NO_x, кислоты, летучие органические соединения

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com

УДК 615.07, 615.38

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, 3, к. 245

1 – Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky, Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: spbpharm@mail.ru
Тел.: 8 (812) 603 24 32

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДАРБЭПОЭТИНА АЛЬФА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРОЛИКОВ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

М.В. Карлина[1], Н.М. Фаустова[1], О.Н. Пожарицкая[1], В.М. Косман[1], В.Г. Макаров[1], А.Н. Шиков[1]*

Резюме. Разработана методика количественного определения дарбэпоэтина α в плазме крови кроликов. Количественное определение проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием коммерчески доступных наборов реагентов для ИФА-анализа «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ». Разработанная методика была валидирована по следующим параметрам: специфичность, линейность, прецизионность, точность (правильность), стабильность образцов. Линейный диапазон методики определения дарбэпоэтина α в плазме крови кроликов составил 67–2000 пг/мл, предел обнаружения – 31 пг/мл. Разработанная методика может быть использована для исследований биоэквивалентности и токсикокинетики препаратов дарбэпоэтина.

Ключевые слова: дарбэпоэтин, ИФА, валидация, фармакокинетика, кролики, плазма.

DETERMINATION OF DARBEPOETIN ALFA IN RABBIT PLASMA BY ELISA

M.V. Karlina[1], N.M. Faustova[1], O.N. Pozharitskaya[1], V.M. Kosman[1], V.G. Makarov[1], A.N. Shikov[1]*

Abstract. Method of quantitative determination of darbepoetin alfa in rabbit blood plasma was developed. Quantitative determination was performed by ELISA using commercially available ELISA kits for assay «Erythropoietin ELISA-Best». The method was validated on the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, and the stability samples. Linear range of methods for determining darbepoetin alfa in the blood plasma of rabbits was 67–2000 pg/mL, the limit of detection – 31 pg/ml. The method can be used for bioequivalence and toxicokinetics studies of drugs of darbepoetin alfa.

Keywords: darbepoetin, ELISA, validation, pharmacokinetics, rabbits, plasma.

ВВЕДЕНИЕ

Глобальный рынок биотехнологий и его медицинская составляющая стремительно растут. Согласно данным Евразийской экономической комиссии в 2015 году мировой объем биотехнологического рынка составил свыше 280 миллиардов долларов. На период до 2020 года ежегодный прирост этого сегмента экономики ожидается в районе 10–13% [1].

В настоящее время биотехнологические препараты используют в терапии метаболических и дегенеративных заболеваний, таких как сахарный диабет, аутоиммунных, онкологических заболеваний, в лечении псориаза и др. Истечение сроков патентной защиты на большинство оригинальных биопрепаратов создало предпосылки к внедрению аналогичных биопрепаратов, так называемых биосимиляров. По прогнозам специалистов, к 2020 г. продажи биосимиляров превысят 100 миллиардов долларов [2].

Изучение на животных токсикокинетики и фармакокинетики биопрепаратов, как оригинальных, так и биоаналогов, является частью комплекса доклинических исследований, который проводят с целью получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства [3, 4]. Учитывая вышесказанное, разработка и валидация методик количественного определения биопрепаратов для изучения их фармакокинетических свойств как никогда актуальна.

Для определения концентраций веществ в биологических жидкостях используют хроматографические, микробиологические, спектрофотометрические, полярографические, иммунологические (радиоиммунные и иммуноферментные), радиоизотопные и другие методы [5]. Наибольшее распространение получили хроматографические методы, однако их применение затруднительно для ряда объектов, в том числе полисахаридов, пептидов и белков, являющихся основой биопрепаратов. Критическими параметрами метода являются чувствительность, точность и быстрота анализа, возможность работы с малыми объемами биоматериала, стоимость анализа. Иммуноферментные методы обладают высокой чувствительностью и избира-

тельностью, наборы для них сравнительно дешевы, они позволяют одновременно тестировать большое количество образцов за короткий промежуток времени, что делает перспективным их использование для определения концентрации действующих веществ биопрепаратов в биологических объектах.

В настоящее время эритропоэтин (ЭПО) остается одним из сложных и популярных объектов биотехнологии рекомбинантных лекарственных белков человека, что связано с его полифункциональной физиологической и терапевтической активностью [6]. В 2000-е годы появился аналог эритропоэтина второго поколения – дарбэпоэтин α (ДЭПО) – генно-модифицированный эритропоэтин с двумя дополнительными N-углеводными цепями, несущими больше (22 вместо 14) остатков сиаловой кислоты [7]. Дарбэпоэтин α нашел широкое клиническое применение для лечения анемий различного генеза, а также ряда онкологических заболеваний благодаря высокой биологической активности за счет большего (в 4–6 раз) по продолжительности периода полувыведения. В Российской Федерации зарегистрирован только один препарат дарбэпоэтина α – «Аранесп», что позволяет предположить возможность скорого появления его биосимиляров и необходимость разработки быстрых методов его количественного анализа в биообразцах.

По сравнению с эндогенным эритропоэтином дарбэпоэтин α имеет незначительные структурные отличия по степени гликозилирования, что позволяет использовать для них близкие аналитические методы. Для определения содержания эритропоэтина в сыворотке (плазме) крови человека и лабораторных животных используют метод конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [8, 9].

Целью настоящего исследования стала разработка методики количественного определения дарбэпоэтина α в плазме крови лабораторных животных с помощью коммерчески доступного набора и её валидация в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методам, и апробация разработанной методики для изучения фармакокинетики дарбэпоэтина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы: препарат «Аранесп» в форме раствора для инъекций (Amgen Manufacturing Limited, Пуэрто-Рико) и наборы реагентов для ИФА-анализа «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» (А-8776, ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) для иммуноферментного определения концентрации эритропоэтина в сыворотке (или плазме) крови и других биологических жидкостях человека.

Методика иммуноферментного определения концентрации эритропоэтина и дарбэпоэтина в плазме крови

Для получения корректных результатов процедуру анализа необходимо проводить непрерывно. Подготовку реагентов осуществляли соответственно рекомендациям инструкции к набору. Во все лунки вносили по 100 мкл раствора для разведения сывороток (РРС). Затем в лунки вносили не менее чем в двух повторностях по 100 мкл растворов калибровочных и контрольных образцов и далее – по 100 мкл исследуемых биопроб. Общее время внесения калибровочных и контрольных образцов и исследуемых проб не превышало 10 мин.

Планшет заклеивали плёнкой и инкубировали при температуре 37 °С в течение 45 мин в термостатируемом шейкере (инкубатор-шейкер ImmunoChem-2200, High Technology Inc., США) с частотой 700 об/мин. По окончании инкубации удаляли содержимое лунок и промывали лунки буферным раствором для промывки (ФСБ-Т) 7 раз по 350 мкл. Планшет с промывочным раствором инкубировали на шейкере при 37 °С в течение 3 мин с частотой вращения 700 об/мин. Затем промывочный раствор декантировали и тщательно удаляли остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

После промывки планшета во все лунки с одинаковой скоростью вносили по 100 мкл конъюгата. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С в термостатируемом шейкере с частотой 700 об/мин. По окончании инкубации лунки планшета тщательно промывали, как описано выше.

Затем во все лунки вносили по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (ТМБ). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в защищенном от света месте в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С. Далее вносили во все лунки по 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ.

Оптическую плотность растворов в лунках измеряли на планшетном спектрофотометре (xMark™ Microplate Spectrophotometer, Bio-Rad, USA) в двухволновом режиме: при длине волны 450 нм (основной фильтр) и 650 нм (референс-фильтр) через 2–3 мин после остановки реакции. Окраска в лунках планшета стабильна при комнатной температуре в течение 10 мин.

Расчет результатов анализов

Построение калибровочного графика проводили для каждого независимого эксперимента (планшета).

1) Рассчитывали разность оптических плотностей при длинах волн 450 нм и 650 нм ($D_{450} - D_{650}$), затем вычисляли исправленную оптическую плотность, вычитая значение, полученное для калибровочного образца с содержанием ЭПО 0 мМЕ/мл (ДЭПО – 0 пг/мл) ($D=D_{ст} - D_{ст0}$), далее определяли среднее значение исправленной оптической плотности (D) для каждого калибровочного образца.

При построении калибровочного графика для ДЭПО в плазме крови кроликов калибровочным образцом с содержанием ДЭПО 0 пг/мл считали плазму крови интактного кролика.

2) Строили калибровочный график в линейных координатах, откладывая по оси Y среднее значение исправленной оптической плотности калибровочных образцов (D), а по оси X – их концентрацию, рассчитывали уравнение регрессии (калибровочное уравнение).

3) Рассчитывали среднее значение исправленной оптической плотности для каждого исследуемого образца.

4) Вычисляли значение концентрации ЭПО в контрольном образце и в исследуемых образцах по калибровочному уравнению.

5) Если концентрация ЭПО в исследуемом образце превышала 200 мМЕ/мл (ДЭПО – 2000 пг/мл), образец разводили РСС и анализировали еще раз. Полученный результат умножали на коэффициент разведения.

6) Для представления результатов измерения концентрации ЭПО в пг/мл значения, полученные в мМЕ/мл, умножали на коэффициент пересчета 8:

1мМЕ/мл=8 пг/мл ЭПО.

Изучение фармакокинетики препарата дарбэпоэтина

Исследование фармакокинетики проводили на кроликах-самцах породы калифорнийская (КФХ «Потапчук М.П.», Россия). Эксперименты были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33044-2014), согласованным с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей, и одобрены на заседании биоэтической комиссии Санкт-Петербургского института фармации.

Дарбэпоэтин α вводили внутривенно и подкожно в дозе 1 мкг/кг веса. Образцы крови кроликов отбирали через 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12 и 24 ч после внутривенного введения и через 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 и 96 ч после подкожного введения, в качестве антикоагулянта использовали динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА-Na_2), образцы центрифугировали для получения плазмы крови (15 мин, 3000 об/мин), полученную плазму замораживали и хранили при –20 °С. Перед началом количественного определения активного ингредиента образцы размораживали.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. Параметры фармакокинетики рассчитаны методом статистических моментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для настоящего исследования был выбран набор реагентов «Эритропоэтин-ИФА-Бест», который сопоставим по своим аналитическим характеристикам с зарубежными аналогами и предназначен для определения уровня эритропоэтина в сыворотке крови человека и других биологических жидкостях, а также для контроля рекомбинантого человеческого эритропоэтина на фармацевтическом производстве [10].

Учитывая, что набор реактивов для ИФА-анализа создан для определения содержания эритропоэтина (а не дарбэпоэтина) в биологических жидкостях человека (а не животных), необходимо подтвердить пригодность набора для выполнения аналитических испытаний в плазме крови экспериментальных животных и далее отработать и валидировать методику определения содержания дарбэпоэтина в плазме крови кроликов. О принципиальной возможности такого использования подобных наборов свидетельствуют работы [9, 11].

На первом этапе работ была проведена оценка пригодности набора реагентов для определения содержания эритропоэтина в контрольном образце, входящем в состав набора, в плазме крови кроликов и в модельных смесях с добавкой препарата, содержащего ДЭПО. Выполнение определения концентрации эритропоэтина точно в соответствии с инструкцией к набору [12] приводило к неадекватным результатам, в связи с чем в методику были внесены изменения [увеличены число и длительность промывок (7 раз по 350 мкл), промывку проводили при повышенной температуре (37 °С), сокращено время инкубации с ТМБ (10 мин)]. Было установлено, что зависимость оптической плотности стандартных растворов от концентрации эритропоэтина является линейной, коэффициент корреляции для всех независимых экспериментов (планшетов) был больше 0,995. Вычисленное по калибровочному уравнению значение концентрации эритропоэтина в контрольном растворе находилось в требуемом диапазоне концентраций от 20 до 30 мМЕ/мл [12], Кроме того, относительные стандартные отклонения (RSD, %), полученные при анализе контрольных растворов из различных наборов одной

серии, меньше 15%, что удовлетворяет валидационным требованиям [13]. Экспериментальные данные, полученные в ходе проверки работоспособности набора, соответствовали требованиям, указанным в инструкции к набору, что позволило сделать вывод о том, что тестируемая система пригодна для дальнейших испытаний.

Поскольку в ходе исследований в методику определения содержания эритропоэтина были внесены некоторые изменения, следующим этапом работы стала её ревалидация и уточнение оптимального типа биологического материала для исследования.

Для выбора оптимального типа биологического материала от интактных кроликов забирали кровь, получали сыворотку и плазму с применением различных антикоагулянтов (гепарин и ЭДТА) и определяли в полученном биоматериале нативное содержание эритропоэтина (таблица 1). Критерием выбора являлось минимальное значение относительного стандартного отклонения, полученное при усреднении результатов.

Таблица 1.

Содержание эритропоэтина в различных видах биологического материала интактных кроликов ($\bar{X}$±SD, мМЕ/мл) (n=4)

Тип биологического материала	Антикоагулянт	Концентрация ЭПО, мМЕ/мл	RSD, %
Сыворотка	–	10,4±1,1	10,6
Плазма	Гепарин натрия	10,8±2,1	19,4
Плазма	ЭДТА-Na_2	10,3±0,2	2,0

Наименьшее значение RSD (2,0%) было получено для плазмы крови кроликов с ЭДТА. Поэтому для дальнейших экспериментов была выбрана плазма с добавлением в качестве антикоагулянта ЭДТА.

Для отработки методики определения содержания дарбэпоэтина в плазме крови кроликов были выполнены аналитические испытания с пробами плацебо и дарбэпоэтином для подтверждения пригодности наборов реагентов для анализа этого соединения и выбора оптимальных концентраций. По результатам проведенных экспериментов установлено мешающее влияние плацебо в диапазоне концентраций выше 10^{-4} мкг/мл, так как оптическая плотность реакционных смесей с плацебо и раствора препарата имели одинаковые значения. При добавлении аналита и плацебо к плазме в объеме не более 20% от объема плазмы плацебо не оказывало влияния на результаты анализа.

Поскольку дарбэпоэтин обладает той же специфичностью, что и нативный эритропоэтин, нет необходимости подтверждать аффинность взаимодействия антител тест-системы и исследуемого аналита и наборы для определения ЭПО могут быть использованы для анализа ДЭПО.

Методики определения содержания ЭПО и ДЭПО в плазме крови кроликов были валидированы согласно рекомендациям [13, 14, 15] по следующим параметрам: специфичность (Specificity), линейность (Linearity), точность (или правильность, Accuracy), прецизионность (Precision).

Специфичность или реже селективность (Selectivity) – способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце (примеси, вспомогательные вещества). Специфичность набора ИФА определяется прежде всего специфичностью антител, иммобилизованных в лунках микропланшета. В описании к набору указано, что специфичность (перекрестная реактивность) для ЭПО составляет 100%.

Для проверки специфичности детектирования окрашенного продукта ферментной реакции были записаны УФ-спектры испытуемых растворов и растворов стандартных образцов ЭПО и ДЭПО в диапазоне длин волн 350–650 нм. Типичные УФ-спектры растворов представлены на рисунке 1.

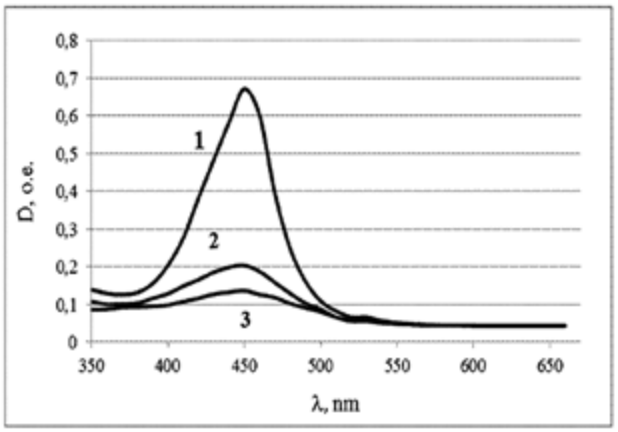


Рисунок 1. Типичные УФ-спектры продуктов реакции, полученные при анализе ЭПО (1 – плазма кролика с добавкой калибровочного раствора ЭПО с концентрацией 800 пг/мл, 2 – плазма кролика с добавкой калибровочного раствора ДЭПО с концентрацией 100 пг/мл; 3 – плазма интактного кролика)

Для детектируемой области характерно наличие четкого максимума при 450±2 нм в пробах, содержащих ЭПО или ДЭПО. Наличие данного максимума в пробе интактной плазмы кролика свидетельствует о присутствии в ней нативного уровня ЭПО.

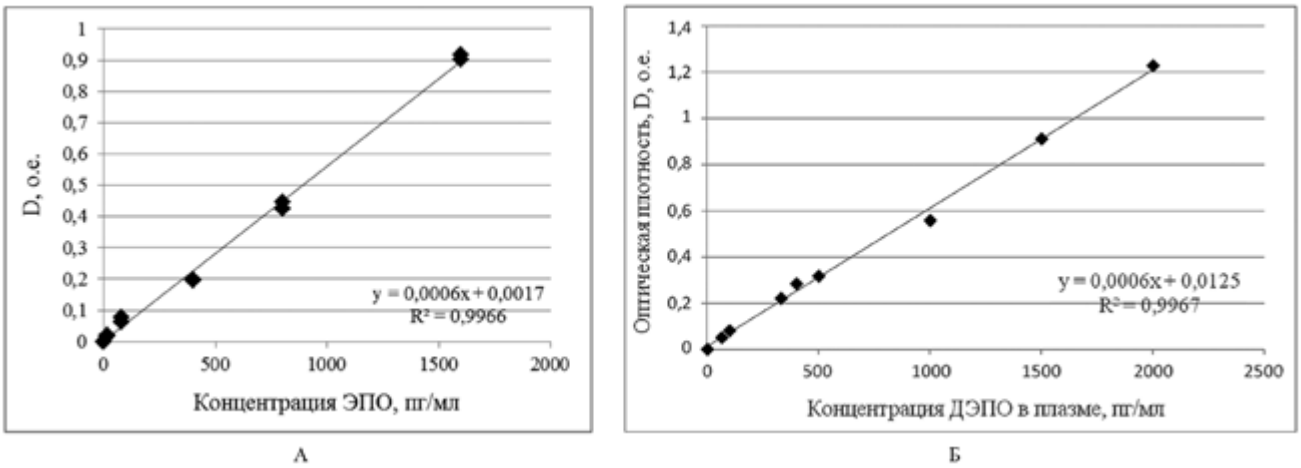


Рисунок 2. Типичная линейная зависимость оптической плотности реакционной смеси от концентрации ЭПО (А) или ДЭПО (Б) в калибровочных образцах (пг/мл)

Для каждого независимого эксперимента (планшета) строили свой калибровочный график и определяли концентрацию ЭПО в контрольном образце. Абсолютные значения оптической плотности растворов плохо воспроизводятся, поэтому для дальнейших расчетов использовали значения исправленной оптической плотности $D=D_{ст}-D_{ст0}$, отличающиеся хорошей воспроизводимостью для всех проведенных независимых экспериментов. Зависимость оптической плотности реакционных смесей от концентрации ЭПО в калибровочных образцах является линейной для диапазона концентраций 16–1600 пг/мл (рисунок 2А). Подобные зависимости были получены для всех независимых экспериментов (планшетов).

Для определения линейного диапазона ДЭПО в плазму крови кроликов вносили определенные количества испытуемых растворов препарата «Аранесп», создавая концентрацию ДЭПО в плазме крови от 0,1 пг/мл до 10000 пг/мл. Для модельных смесей плазмы интактных кроликов с растворами препарата с концентрацией выше 2000 пг/мл получали D раствора больше 2 о.е. и выходили за границы линейности спектрофотометра. Для модельных смесей плазмы с растворами ДЭПО с концентрациями меньше 67 пг/мл оптическая плотность реакционных смесей не имела статистических значимых отличий от значений, получаемых для плазмы интактных кроликов. Зависимость оптической плотности растворов ДЭПО от концентрации имеет линейный характер в пределах от 67 до 2000 пг/мл (рисунок 2Б). Согласно рекомендациям [15, 16] концентрация ДЭПО, соответствующая наименьшей точке на калибровочной кривой, была принята в качестве нижнего предела количественного определения, то есть НПКО= 67 пг/мл. Предел обнаружения (ПО), или чувствительность методики для ЭПО и ДЭПО, рассчитывали по формуле $D_{ПО}=D_{плазма}+2SD_{плазма}$. Затем полученное значение $D_{ПО}$ использовали для расчетов ПО в пг/мл по калибровочному уравнению. ПО в плазме крови кролика не превышало для ЭПО 3, 84 пг/мл, для ДЭПО – 45 пг/мл.

Валидационные параметры методик определения ЭПО и ДЭПО в плазме крови кроликов представлены в таблице 2. По всем параметрам получены результаты, удовлетворяющие требованиям [13–15].

Таким образом, методики количественного определения эритропоэтина и дарбэпоэтина в плазме кроликов методом ИФА с применением наборов для ИФА-анализа «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» валидированы в соответствии с современными требованиями и удовлетворяют им по всем показателям.

Разработанная и валидированная методика была применена для анализа биопроб, полученных после внутривенного и подкожного введения ДЭПО (рисунок 3).

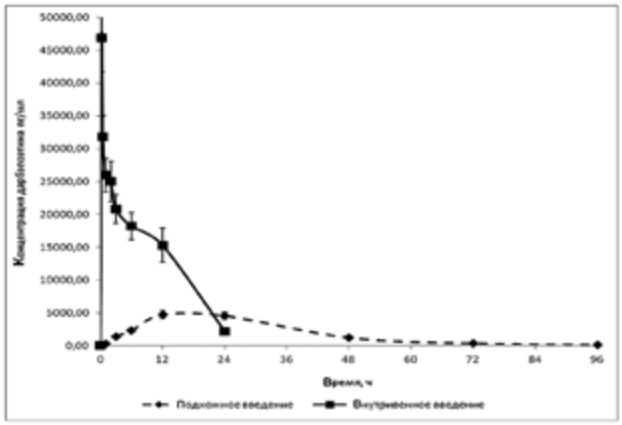


Рисунок 3. Кривая «концентрация – время» суммы эритропоэтина и дарбэпоэтина при однократном внутривенном и подкожном введении препарата «Аранесп» (n=6, $\bar{X}\pm S\bar{x}$)

Таблица 2.

Сводная таблица с результатами валидации методик определения эритропоэтина и дарбэпоэтина в плазме крови кроликов

Валидационный параметр	Уровень концентрации	Критерий приемлемости	Результат			
			Эритропоэтин		Дарбэпоэтин	
Специфичность детектирования окрашенного продукта	Плазма интактных кроликов, плазма с добавкой ДЭПО	Способность дифференцировать аналит от эндогенных компонентов матрицы и других компонентов образца	Подтверждена увеличением оптической плотности в максимуме при 450 нм на фоне компонентов плазмы крови			
Линейный (калибровочный) диапазон	Калибровочные стандарты не менее чем шести концентраций, не менее 3 серий	Коэффициент корреляции линейной регрессии (r), r>0,99	16–1600 пг/мл, r>0,996		67–2000 пг/мл, r>0,995	
Нижний предел количественного определения (НПКО)	Концентрация аналита, соответствующая наименьшей точке на калибровочной кривой	НПКО Точность, менее 20% Прецизионность, менее 20%	16 пг/мл		67 пг/мл 12,9 15,6	
Предел обнаружения, пг/мл	Наименьшее количество анализируемого вещества, которое может быть обнаружено, но не оценено точно количественно		3,84		45,0	
Точность, %	ВПКО Середина линейного диапазона 3*НПКО НПКО	Не более 15% Не более 15% Не более 15% Не более 20%	1600пг/мл 800 пг/мл 48 пг/мл 16 пг/мл	0,91 3,8 12,6 12,5	2000пг/мл 1000 пг/мл 201 пг/мл 67 пг/мл	2,0 4,8 6,3 12,9
Внутридневная // междневная прецизионность, %	ВПКО Середина линейного диапазона 3*НПКО НПКО	Не более 15% Не более 15% Не более 15% Не более 20%	1600пг/мл 800 пг/мл 48 пг/мл 16 пг/мл	3,1–5,7//11,0 3,5–7,2//13,6 10,1–14,3//14,1 17,2–9,3//11,9	2000пг/мл 1000 пг/мл 201 пг/мл 67 пг/мл	2,4–5,2//3,3 2,1–7,2//5,1 4,2–8,8//6,2 8,3–11,3//13,0

Как видно из представленных данных, максимальная концентрация действующего вещества препарата в плазме крови после внутривенного введения наблюдается в первой точке отбора проб, максимальная концентрация после подкожного введения – через 12–24 ч после введения препарата. Значения максимальной концентрации после внутривенного введения практически в 9 раз выше, чем после подкожного. Параметры фармакокинетики, рассчитанные внемодельным методом – методом статистических моментов, приведены в таблице 3.

Установлено, что период полувыведения ($T_{1/2}$), среднее время удержания (MRT), время достижения максимальной концентрации в 1,6, 2,6 и 72 раза соответственно выше после подкожного введения, что свидетельствует о значительно более медленном выведении препарата после его подкожного введения. Значения максимальной концентрации и площади под фармакокинетической кривой значительно выше после внутривенного введения.

Таблица 3.

Показатели фармакокинетики дарбэпоэтина при однократном внутривенном и подкожном введениях препарата «Аранесп»

	C_{max}, пг/мл	AUC_{0-24}, ч×пг/мл	$AUC_{0-\infty}$, ч×пг/мл	$AUMC_{0-24}$, пг×ч²/мл	MRT, ч	$T_{1/2}$, ч	T_{max}, ч
Внутривенное введение							
среднее	46839	351494	376553	3589690	10,0	7,3	0,25
Sx	5088	42485	37104	312206	1,5	1,2	0,0
Подкожное введение							
среднее	5348	173637	174938	4607400	26,2	11,6	18,0
Sx	450	15940	16084	560965	1,4	1,1	2,7

Абсолютная биологическая доступность (f_a) препарата «Аранесп» при подкожном введении, рассчитанная как отношение значений AUC при подкожном введении и внутрисосудистом введении препарата, составила около 50%, что сопоставимо с данными, полученными для дарбэпоэтина ранее на крысах [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработана методика определения содержания дарбэпоэтина в плазме крови экспериментальных животных (кроликов) с помощью наборов реагентов для ИФА-анализа «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ». При подтверждении пригодности наборов для выполнения аналитических испытаний методика определения эритропоэтина была оптимизирована, экспериментально обоснован выбор в качестве биологического материала плазмы крови кроликов с добавлением в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусной кислоты. Показана пригодность данных наборов для определения содержания как эритропоэтина, так и дарбэпоэтина в плазме крови лабораторных животных. Методика определения дарбэпоэтина α в плазме кроликов валидирована в соответствии с современными требованиями к валидации биоаналитических методик по показателям: специфичность, линейность, прецизионность, точность (правильность). Линейный диапазон для дарбэпоэтина α составил от 67 до 2000 пг/мл, предел обнаружения – 31 пг/мл. Разработанная методика успешно применена для изучения фармакокинетических свойств препарата «Аранесп» при его внутривенном и подкожном введении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евразийская экономическая комиссия. Департамент промышленной политики. Информация о результатах анализа состояния и развития биотехнологической отрасли государств – членов Евразийского экономического союза. Москва. 2015. URL: http://www.eurasiancommission.org/ru/act/prom_i_agroprom/dep_prom/SiteAssets/ (дата обращения 14.06.2016).
2. Е.А. Ельцова, Г.В. Раменская, Е.А. Смолярчук, А.В. Бушманова. Биосимиляры – препараты будущего // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2015. № 1. С. 12–15.
3. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 1. – М.: Гриф и К. 2013. С. 268–303.
4. Р. Иванов, Г. Секарёва, О. Кравцова и др. Правила проведения исследований биоаналоговых лекарственных средств (биоаналогов) // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2014. № 1. С. 21–36.
5. Д.В. Рейхарт, В.В. Чистяков. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях // Казанский медицинский журнал. 2010. № 4(91). С. 532–536.
6. Н.А. Гаврилова, А.М. Черемных, Н.А. Бобренева и др. Гемопоэтическая активность и фармакокинетика гибридных белков EPO-Fc, EPO-Fcneo и Alb-EPO – производных эритропоэтина человека // Биотехнология. 2012. № 5. С. 38–49.
7. J.C. Egrie, E. Dwyer, J.K. Browne et al. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant erythropoietin // Experimental Hematology. 2002. V. 31. P. 290–299.
8. В.М. Ермоленко, О.Б. Маргиева, Е.В. Шутов, А. Усубалива. Фармакокинетика рекомбинантного человеческого эритропоэтина (рчЭРП) при внутривенном, подкожном и внутрибрюшном введении у больных на перитонеальном диализе (ПД) // Нефрология и диализ. 2004. № 3(6). С. 235–238.
9. B. Agoram, A.C. Heatherington, M.R. Gastonguay. Development and evaluation of a population pharmacokinetic-pharmacodynamic model of darbepoetin alfa in patients with nonmyeloid malignancies undergoing multicycle chemotherapy // The AAPS Journal. 2006. V. 8. № 3. P. E552–E562.
10. Т.И. Колочева, С.С. Решетников. Новый набор реагентов для определения эритропоэтина в биологических жидкостях // Новости «Вектор-Бест». 2008. № 2 (48). С. 9–12. URL: https://vector-best.ru/publ/nvb/n48.pdf (дата обращения 15.06.2016).
11. M. Allon, K. Kleinman, M. Walczyk et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of darbepoetin alfa and epoetin in patients undergoing dialysis // Clinical Pharmacology & Therapeutic. 2002. V. 72. P. 546–555.
12. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации эритропоэтина в сыворотке (плазме) крови. Инструкция по применению. Новосибирск: Вектор-Бест. 2012. 27 с.
13. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London, 2009.
14. МУ 3.3.2.1886-04. Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: порядок проведения и представления результатов. Методические указания. 2004.
15. Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. – Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2001.
16. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011.
17. E. Yoshioka, K. Kato, H. Shindo et al. Pharmacokinetic study of darbepoetin alfa: absorption, distribution, and excretion after a single intravenous and subcutaneous administration to rats // Xenobiotica. 2007. № 37(1). P. 74–90.

Сделайте анализ проще и измените будущее уже сегодня

Сбор, анализ и визуализация данных о клетках всего за 1 шаг.

Система визуализации клеток Cytell

- это клеточный анализатор, сочетающий в себе функции цифрового микроскопа и счетчика клеток.

Позволяет анализировать клеточный цикл и жизнеспособность клеток и формировать отчеты о проведенном анализе.

Прост в использовании, достаточно мал, чтобы поместиться на вашем рабочем столе, и достаточно мощный, чтобы удовлетворить потребности самого опытного исследователя.

Официальный Дистрибьютор

Pharmcontract® group of companies

+7 (495) 252-00-98
(Центральный офис в Москве)
8 (800) 333-42-24
(Бесплатный звонок по России)

www.phct.ru
info@phct.ru

www.gelifesciences.com/cytell

GE, монограмма GE являются товарными знаками General Electric Company. Cytell является товарным знаком General Electric Company или одного из ее подразделений.

© 2016 General Electric Company - все права защищены.

ООО «ДжиИ Хэлскеа», Пресненская наб., д. 10, 123317, г. Москва, Россия
тел.: +7 (495) 739-69-31, факс:+7 (495) 739-69-32, e-mail: LSrus@ge.com

JB42996RU

УДК 616.89

1 – НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634014, Россия, г. Томск, ул. Алеутская, 4

1 – Mental Health Research Institute, Tomsk national research medical center of the Russian Academy of Sciences, Aleutskaya street, 4, Tomsk, 634014, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: anastasya-iv@yandex.ru
Тел.: 8 (3822) 72 43 49

ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ, ДЛИТЕЛЬНО ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИПСИХОТИЧЕСКУЮ ТЕРАПИЮ

А.С. Бойко[1]*, И.С. Лосенков[1], Е.Г. Дмитриева[1]

Резюме. Проведено комплексное клинико-биологическое исследование 115 больных шизофренией, длительно получающих антипсихотическую терапию. Концентрации мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и пролактина в сыворотке крови у больных шизофренией и здоровых лиц определяли на мультиплексном анализаторе MAGPIX (Luminex, США) с использованием наборов MILLIPLEX® MAP (Merck, Германия). Выявлено, что концентрация BDNF статистически значимо коррелировала с выраженностью позитивной симптоматики у больных шизофренией. Индуцированная антипсихотическими препаратами гиперпролактинемия диктует необходимость мониторинга уровня пролактина для разработки персонализированных подходов к терапии и повышения качества жизни пациентов.

Ключевые слова: мозговой нейротрофический фактор, пролактин, шизофрения, мультиплексный анализ, антипсихотическая терапия.

MULTIPLEX ANALYSIS OF PERIPHERAL BIOMARKERS IN SCHIZOPHRENIC PATIENTS WITH LONG-TERM ANTIPSYCHOTIC THERAPY

A.S. Boiko[1]*, I.S. Losenkov[1], E.G. Dmitrieva[1]

Abstract. Complex clinical and biological study of 115 schizophrenic patients with long-term antipsychotic treatment was carried out. Concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and prolactin levels in blood serum in schizophrenic patients and healthy subjects were determined to multiplex analyzer MAGPIX (Luminex, USA) using the kits MILLIPLEX® MAP (Merck, Germany). BDNF concentration was significantly correlated with the severity of positive symptoms in schizophrenic patients. Antipsychotics induced hyperprolactinemia is the need to monitor the level of prolactin to develop personalized approaches to treatment and improve the quality of life of patients.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor, prolactin, schizophrenia, multiplex analysis, antipsychotic therapy.

ВВЕДЕНИЕ

Шизофрения относится к социально значимым заболеваниям человека в связи с высокой распространенностью, прогредиентностью, тяжестью социальных последствий и высоким бременем экономических затрат. Распространенность шизофрении составляет около 1%, и это заболевание является одним из наиболее губительных нейропсихических заболеваний, присущих человеческой популяции [1]. Болезнь характеризуется сочетанием продуктивной (галлюцинаторно-бредовой, аффективной и др.) и негативной (апатия, абулия, эмоциональная и социальная отгороженность и др.) симптоматики, поведенческих и когнитивных нарушений (памяти, внимания, мышления и др.) [2, 3].

Несмотря на многолетние фундаментальные исследования шизофрении, патогенез заболевания неизвестен. В настоящее время основные направления исследований имеют трансляционную направленность и связаны с поиском биомаркеров заболевания и разработкой персонализированных подходов к терапии [4, 5].

В качестве возможных периферических биомаркеров, которые перспективно использовать в качестве диагностических факторов и прогноза ответа на терапию (тераностика), предлагаются показатели, связанные с нейропротективными и нейротрофическими системами [6]. Нейротрофические факторы оказывают наиболее сильное трофическое влияние на все основные процессы жизнедеятельности нейронов.

Это регуляторные белки нервной ткани, которые синтезируются в нейронах и глии. К нейротрофическим факторам мозга относятся фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор мозга (BNDF), нейротрофины и др.

BDNF, как известно, отвечает за развитие, регенерацию, сохранение и поддержание нейронов, участвует в дифференцировке нейронов, созревании, выживании и формировании синапсов. Во взрослом организме основная функция BDNF – нейропротекция.

Нейропептид пролактин, который обычно рассматривается как гормон, регулирующий физиологические реакции, связанные с репродуктивной функцией, в то же время обладает плейотропными эффектами в отношении процессов адаптации, стресса, нейрогенеза и нейропротекции [7].

Нарушение концентрации пролактина при шизофрении может быть вызвано дофаминергическим дисбалансом, характерным для данного заболевания. Пролактин является единственным из гормонов передней доли гипофиза, который находится под тоническим ингибирующим влиянием гипоталамуса. Это ингибирующее действие обусловлено дофамином посредством стимуляции дофаминовых рецепторов, локализованных на лактотрофах. Дофамин и его агонисты стимулируют D2-рецепторы, что приводит к ингибированию аденилатциклазы с соответствующим снижением высвобождения и секреции пролактина.

Антипсихотические препараты, применяемые в терапии шизофрении, зачастую приводят к повышению уровня пролактина (гиперпролактинемии). Гиперпролактинемия осложняет течение основного заболевания, усиливая выраженность негативных и аффективных расстройств, приводит к дополнительной социальной стигматизации пациентов, ухудшает качество их жизни и является причиной отказа пациентов от проводимой терапии [8, 9].

Целью настоящего исследования явилось определение концентрации мозгового нейротрофического фактора и пролактина у больных шизофренией, длительно получающих антипсихотическую терапию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было проведено комплексное клинико-биологическое обследование 115 больных шизофренией, находящихся на лечении в психиатрическом стационаре. Включение пациентов и лиц контрольной группы в исследование проводилось с учетом этических норм согласно протоколу, утвержденному локальным этическим комитетом при НИИ психического здоровья (протокол № 80 от 22 июня 2015). У всех обследуемых лиц получено информированное согласие на проведение исследования.

Проводилась стандартизация группы по полу, возрасту, стадии и длительности заболевания, тяжести актуального состояния и коморбидной патологии. На всех пациентов заполнялся модифицированный вариант базисной карты стандартизированного описания больного шизофренией и шкала позитивных и негативных синдромов (Positive and Negative Syndrome Scale, PANSS).

Критериями включения в исследование являлись возраст пациентов от 18 до 65 лет; диагноз по МКБ-10: лица, имеющие верифицированный диагноз «шизофрения» [F20.0 – параноидная шизофрения, F20.5 – остаточная шизофрения (резидуальное шизофреническое состояние), F20.6 – простой тип шизофрении]; наличие подписанной формы информированного согласия на участие в исследовании.

Все пациенты в момент обследования получали антипсихотическую терапию. Назначение антипсихотических препаратов осуществлялось с учетом ведущей симптоматики, спектра психотропной активности нейролептика, а также характера возможных побочных эффектов и противопоказаний к применению. В качестве психотропной терапии пациенты получали препараты в виде монотерапии или их комбинаций: традиционные (галоперидол, хлорпромазин, хлорпротиксен) и атипичные антипсихотические препараты (рисперидон, клозапин, кветиапин).

Для создания контрольной группы для лабораторных исследований было обследовано 22 психически и соматически практически здоровых лица, соответствующих по полу и возрасту обследуемой группе больных, не имеющих хронических заболеваний и не состоящих на диспансерном учете, без признаков перенесенных острых инфекционных заболеваний на момент обследования.

В качестве исследуемого материала для биохимических исследований использовалась сыворотка крови. Утром, натощак, производится взятие образца крови у пациента из локтевой вены в пробирки фирмы Vacutainer (Becton Dickinson, США) с активатором свертывания крови (инертными силиконовыми частицами – SiO2, нанесенными на внутренние стенки пробирки). Для получения сыворотки пробирку с венозной кровью центрифугируют при 1500 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования полученную сыворотку забирают для исследования с помощью пипеточного дозатора индивидуальными сменными наконечниками в пластиковые пробирки типа «эппендорф» в количестве, не превышающем 40% от объема пробирки. После этого производят замораживание

сыворотки крови при разделении ее на несколько дублирующих аликвот в пробирках типа «эппендорф». Замораживание образцов сыворотки крови в морозильной камере при температуре –18...–20 °С позволяет хранить образцы в течение 1–1,5 месяцев, при более низких температурах –65...–80 °С срок их хранения практически не лимитируется.

Концентрация BDNF и пролактина определялась на мультиплексном анализаторе MAGPIX (Luminex, США) с использованием наборов MILLIPLEX® MAP (Merck, Германия). Конечные результаты выражали в нг/мл.

Мультиплексный анализатор MAGPIX

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета SPSS 20.0 для Windows (SPSS: An IBM Company, США). Выборки проверяли на нормальность распределения по критерию Шапиро – Уилка. Для независимых выборок при распределении, отличающемся от нормального, достоверность различий определяли по U-критерию Манна – Уитни с вычислением медианы и квартилей (Me [Q1; Q3]). Различия считали достоверными при p≤0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследуемой выборке пациентов преобладали мужчины (85 человек, 73,9%), женщины составили 26,1% (30 человек). В исследование включены лица от 18 до 65 лет, медиана возраста составила 38 (31, 47) лет. Средняя продолжительность заболевания (в годах) составила 10,0 (5,0 – 19,75).

Больные имели следующие баллы по шкале PANSS: балл для позитивных симптомов составил 19,0 (12,0–25,0), балл для негативных симптомов – 24,0 (18,0–30,0), балл для общих психопатологических симптомов – 45,0 (36,0–60,0), общий балл – 88,0 (68,0–112,0).

Концентрация BDNF в сыворотке крови здоровых лиц и больных шизофренией статистически не различалась (таблица 1).

Таблица 1.

Концентрация BDNF (нг/мл) в сыворотке крови здоровых лиц и больных шизофренией (Me [Q1; Q3])

	Концентрация BDNF, нг/мл	Критерий Манна-Уитни
Здоровые лица	2,2 [0,9; 3,2]	p=0,612
Больные шизофренией	2,3 [1,1; 3,7]	

В связи с физиологическими особенностями содержание пролактина в сыворотке крови женщин имеет более высокий уровень по сравнению с показателями мужчин. Поэтому при анализе результатов исследуемые выборки были разделены по полу. У больных шизофренией наблюдается достоверное повышение концентрации пролактина по сравнению со значениями здоровых лиц (таблица 2).

Таблица 2.

Концентрация пролактина (нг/мл) в сыворотке крови здоровых лиц и больных шизофренией (Me [Q1; Q3])

Группа		Концентрация пролактина, нг/мл	Критерий Манна – Уитни
Мужчины	Здоровые лица	10,0 [6,0; 13,2]	p<0,001
	Больные шизофренией	19,0* [10,3; 34,2]	
Женщины	Здоровые лица	12,3 [6,7; 16,8]	p<0,001
	Больные шизофренией	45,4* [14,9; 76,4]	

При этом у больных шизофренией женского пола наблюдается ярко выраженная гиперпролактинемия. Критерием постановки ГП у женщин является концентрация пролактина свыше 25 нг/мл, для мужчин – 20 нг/мл.

Пациенты были разделены на группы в зависимости от длительности заболевания. Содержание BDNF в сыворотке крови у больных в этих группах достоверно не отличалось (таблица 3).

Таблица 3.

Концентрация BDNF (нг/мл) в сыворотке крови больных шизофренией в зависимости от длительности заболевания (Me [Q1; Q3])

	Длительность заболевания				Критерий Краскела – Уоллиса
	Менее 3 лет	От 3 до 5 лет	От 6 до 10 лет	Более 10 лет	
BDNF, нг/мл	3,2 [1,0; 6,2]	2,4 [0,9; 4,3]	2,9 [1,7; 3,9]	2,0 [0,9; 3,2]	p=0,355

При анализе уровня пролактина было выявлено повышение концентрации пролактина у больных шизофренией с продолжительностью заболевания от 3 до 5 лет по сравнению с другими группами (таблица 4).

Таблица 4.

Концентрация пролактина (нг/мл) в сыворотке крови больных шизофренией в зависимости от длительности заболевания (Me [Q1; Q3])

	Длительность заболевания			
	Менее 3 лет	От 3 до 5 лет	От 6 до 10 лет	Более 10 лет
Мужчины	14,9 [6,6; 45,14]	32,5 [17,7; 60,26]	16,6* [10,2; 30,2]	18,2** [10,0; 31,3]
Женщины	57,4 [27,6; 93,2]	95,1 [41,3; 104,2]	25,6# [10,1; 51,8]	40,9## [14,1; 72,9]

Примечание: * – p=0,015, ** – p=0,014, # – p=0,03, ## – p=0,07 – уровень статистической значимости различий концентраций пролактина у больных шизофренией с разной длительностью заболевания по сравнению с показателем пациентов, болеющих от 3 до 5 лет.

Была определена ведущая симптоматика больных шизофренией: позитивная симптоматика зарегистрирована у 54,8% пациентов, негативная – у 37,3%, не удалось установить ведущую симптоматику у 7,9% больных. В зависимости от этого распределения была проанализирована концентрация мозгового нейротрофического фактора: у пациентов с преобладанием позитивного профиля уровень BDNF составил 2,5 (1,2; 3,8) нг/мл, при негативной симптоматике наблюдалась незначительная тенденция к снижению – 1,9 (0,7; 3,3) г/мл (p=0,19).

Аналогичная ситуация наблюдается при анализе уровня пролактина: в зависимости от ведущего профиля симптоматики достоверных различий выявлено не было (таблица 5).

Таблица 5.

Концентрация пролактина (нг/мл) в группах больных шизофренией с преобладанием позитивной либо негативной симптоматики (Me [Q1; Q3])

Группа		Концентрация пролактина, нг/мл	Критерий Манна – Уитни
Мужчины	Больные шизофренией с преобладанием позитивной симптоматики	19,8 [10,5; 42,6]	p=0,822
	Больные шизофренией с преобладанием негативной симптоматики	18,7 [9,3; 30,2]	
Женщины	Больные шизофренией с преобладанием позитивной симптоматики	45,4 [18,6; 79,8]	p=0,321
	Больные шизофренией с преобладанием негативной симптоматики	27,8 [6,8; 81,4]	

Для установления факта наличия связи между концентрацией BDNF в сыворотке крови и выраженностью позитивных, негативных и общих психопатологических симптомов, оцененных по шкале PANSS, был проведен корреляционный анализ (таблица 6).

Таблица 6.

Коэффициенты корреляции Спирмена баллов по шкале позитивных и негативных синдромов и концентрации BDNF в сыворотке крови больных шизофренией

Баллы по шкале PANSS	Концентрация BDNF в сыворотке крови
Позитивная симптоматика	r=0,284 **p=0,004**
Негативная симптоматика	r=0,115 p=0,126
Общие психопатологические симптомы	r=-0,013 p=0,895

Была выявлена положительная корреляция (r=0,284, p=0,004) между уровнем BDNF в сыворотке крови больных шизофренией и баллом по шкале

PANSS для позитивных симптомов. В то же время не было найдено статистически значимой корреляции концентрации BDNF и балла по шкале PANSS для негативных и общих психопатологических симптомов. Как и в случае корреляционного анализа концентрации пролактина и ведущей симптоматики, достоверных результатов не выявлено (таблица 7).

Таблица 7.

Коэффициенты корреляции Спирмена баллов по шкале PANSS и концентрации пролактина в сыворотке крови больных шизофренией

Группа	Баллы по шкале PANSS	Концентрация пролактина в сыворотке крови
Мужчины	Позитивная симптоматика	r=0,021 p=0,832
	Негативная симптоматика	r=0,097 p=0,316
	Общие психопатологические симптомы	r=-0,064 p=0,507
Женщины	Позитивная симптоматика	r=0,046 p=0,790
	Негативная симптоматика	r=-0,224 p=0,188
	Общие психопатологические симптомы	r=-0,160 p=0,351

Литературные данные о содержании BDNF в сыворотке крови противоречивы. В метаанализе Green M.J. et al. [10] была показана низкая концентрация BDNF у больных шизофренией. Ряд исследований продемонстрировал высокий уровень BDNF в сыворотке крови больных шизофренией [11]. В работе T.L. Huang and C.T. Lee [12] не было найдено различий в концентрации BDNF между группами контроля и больных шизофрений. Отсутствие различий в концентрации BDNF, выявленное в нашем исследовании, может быть объяснено гетерогенностью группы по полу, возрасту и длительности заболевания, наличию соматической патологии.

В данном исследовании высокая концентрация BDNF статистически значимо коррелировала с выраженностью позитивной симптоматики у больных шизофренией. В настоящее время известно, что дофаминергическая система вовлечена в патогенез шизофрении, в частности в формирование позитивной симптоматики [13]. Между BDNF и дофаминергической системой существует тесная связь. Данный белок обладает протективным эффектом в отношении дофаминергических нейронов и способствует их выживаемости. Дофамин, в свою очередь, способен индуцировать транскрипцию гена BDNF. Вероятно, что при формировании позитивных симптомов шизофрении наблюдается повышенный синтез BDNF за счет активации дофаминергической системы. Также, возможно, сам BDNF может усиливать позитивные симптомы, обеспечивая выживаемость дофаминергических нейронов.

Синдром гиперпролактинемии – патологическое состояние, характеризующееся наличием повышенного пролактина в сыворотке и клинической симптоматикой. В нашем исследовании было выявлено повышение концентрации пролактина больных шизофренией по сравнению с контрольной группой. Гиперпролактинемия у больных шизофренией чаще всего связана с приемом антипсихотических препаратов: так, индуцированная традиционными антипсихотическими препаратами гиперпролактинемия диагностируется в среднем, по данным литературы, у 47–50% больных [14].

У пациентов с длительностью заболевания более 3 лет выявлено существенное повышение концентрации гормона по сравнению с лицами, болеющими меньшее время. Чем дольше продолжительность заболевания, тем дольше и прием антипсихотических препаратов, что вызывает постепенное и продолжительное нарастание концентрации пролактина. При дальнейших метаболических нарушениях происходит компенсаторная реакция организма антогонистического действия, приводящая к постепенному снижению уровня гормона.

Наиболее часто уровень пролактина повышается у женщин репродуктивного возраста (65%) и постменопаузальном периоде (45%), а у мужчин – в 42% случаев. Эти показатели могут быть занижены, так как в большинстве случаев гиперпролактинемия регистрируется по обращаемости при появлении симптомов, а клиническая симптоматика нередко отсутствует. В одном из скрининговых исследований у 194 пациентов, получавших нейролептики, уровень пролактина определяли независимо от наличия клинических проявлений, при этом частота ГП составила 38%. В ретроспективных исследованиях встречаются данные о распространенности ГП у 68% больных [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск биомаркеров, которые могут быть использованы в диагностике, оценке ведущей симптоматики, предикции ответа на терапию и развитие побочных эффектов у больных шизофренией является

важным шагом по направлению к разработке персонализированной терапии. Большинство биологических исследований при шизофрении проведены на тканях мозга и в настоящий момент не транслированы в конкретные биомаркеры для практического использования в связи с недоступностью биопсии мозга; современные техники нейровизуализации являются дорогостоящими, и результаты, полученные с их применением, представляются неоднозначными. В связи с этим определение периферических биомаркеров («blood-based biomarkers») при шизофрении с использованием мультиплексного анализа, позволяющего одновременно в пробах определять несколько субстанций, является реально существующей альтернативой. Полученные в нашем исследовании результаты демонстрируют необходимость проведения определения концентрации пролактина у больных шизофренией, длительно получающих антипсихотическую терапию, для своевременной диагностики гиперпролактинемии, как побочного эффекта фармакотерапии, и изменения терапевтической тактики ведения пациентов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-15-00480 «Поиск ключевых биомаркеров патогенеза социально значимых эндогенных психических расстройств».

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Tandon, M. S. Keshavan, H. A. Nasrallah. Schizophrenia, «just the facts» what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology // Schizophr. Res. 2008. V. 102 (1–3). P. 1–18.
2. А.С. Тиганов, А.В. Снежневский, Д.Д. Орловская и др. Руководство по психиатрии. В 2 томах. Т. 1 / Под ред. А.С. Тиганова. — М.: Медицина, 1999. 712 с.
3. А.В. Семке, Т.П. Ветлугина, Л.Д. Рахмазова, С.А. Иванова, Е.Д. Счастный, О.Ю. Федоренко, О.А. Лобачева, Е.В. Гуткевич, Е.Г. Корнетова, О.А. Даниленко. Биологические и клинико-социальные механизмы развития шизофрении (итоги комплексной темы НИР ФГБУ «НИИПЗ» СО РАМН, 2009–2012 гг.) // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2013. № 4 (79). С. 18–26.
4. С.А. Иванова, О.Ю. Федоренко, Л.П. Смирнова, А.В. Семке. Поиск биомаркеров и разработка фармакогенетических подходов к персонализированной терапии больных шизофренией // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2013. № 1. С. 12–16.
5. М.Г. Узбеков, И.Я. Гурович, С.А. Иванова. Потенциальные биомаркеры психических заболеваний в аспекте системного подхода // Социальная и клиническая психиатрия. 2016. Т. 26. Вып. 1. С. 5–11.
6. C.Y. Lai, E. Scarr, M. Udawela, I. Everall, W. J. Chen, B. Deani. Biomarkers in schizophrenia: A focus on blood based diagnostics and theranostics // World J Psychiatry. 2016. № 6(1). P. 102–17.
7. L. Torner. Actions of Prolactin in the Brain: From Physiological Adaptations to Stress and Neurogenesis to Psychopathology // Front. Endocrinol. 2016. 7:25.
8. Л.Н. Горобец Нейроэндокринные дисфункции и нейролептическая терапия. – М.: Медпрактика-М, 2007.
9. Е. Г. Корнетова, С.А. Иванова, А.В. Семке, Ю.Н. Бородюк, А.С. Бойко. Гиперпролактинемия как побочный эффект антипсихотической терапии больных шизофренией // Пособие для врачей. – Томск, 2015. 28 с.
10. M.J. Green, S.L. Matheson, A. Shepherd, C.S. Weickert, V.J. Carr. Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis // Mol Psychiatry. 2011. V. 16. № 9. P. 960–972.
11. H. J. Reis, R. Nicolato, I.G. Barbosa, P.H. Teixeira do Prado, M.A. Romano-Silva, A. L. Teixeira. Increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in chronic institutionalized patients with schizophrenia // Neurosci Lett. 2008. V. 439. № 2. P.157–159.
12. T.L. Huang, C.T. Lee. Associations between serum brain-derived neurotrophic factor levels and clinical phenotypes in schizophrenia patients // Journal of Psychiatry Research. 2006. V. 40. № 7. P. 664–668.
13. J.M. Stone, P.D. Morrison, L.S. Pilowsky. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia-a synthesis and selective review // J Psychopharmacol. 2007. V. 21. № 4. P. 440–452.
14. О.А. Юнилайнен, Е.Г. Старостина, Л.К. Дзеранова, Г.С. Колесникова. Н.П. Гончаров, Э.Г. Рытик, Г.Н. Кудряшкина, Е.Н. Тулинцева, Л. Г. Кессельман, П.А. Баранов, И.И. Дедов. Эпидемиологические характеристики гиперпролактинемии, ассоциированной с приемом нейролептиков // Современная терапия в психиатрии и неврологии. 2014. № 4. С. 12–23.
15. J. Montgomery, E. Winterbottom, M. Jessani, E. Kohegyi, J. Fulmer, B. Seamonds, R.C. Josiassen. Prevalence of hyperprolactinemia in schizophrenia: association with typical and atypical antipsychotic treatment // J. Clin. Psychiatry. 2004. V. 65. № 11. P. 1491–1498.

УДК 615.03

1 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, Москва, Научный проезд, 20, стр. 3

2 – Ассоциация по сертификации «Русский Регистр», 190121, Санкт-Петербург, пр. Римского-Корсакова, 101

1 – Center of Pharmaceutical Analytics Ltd, 20, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – Certification Association «Russian Register», 101, Rimskogo-Korsakova pr., St.-Petersburg, 190121, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: a.a.krylatova@gmail.com

ОПЫТ СЕРТИФИКАЦИИ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ СОГЛАСНО ГОСТ 33044-2014 «ПРИНЦИПЫ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ»

А.А. Крылатова[1]*, И.Е. Шохин[1], Е.П. Образцова[2], А.О. Монаенков[2]

Резюме. Наличие сертификата соответствия требованиям стандарта ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», выданного международно признанным, компетентным и независимым органом по сертификации, служит для многих заказчиков одним из критериев при выборе подрядчика и гарантией качества оказываемых им услуг, а также одним из обязательных условий выхода и развития организации на мировом, национальном или отраслевом рынках. В статье описан первый опыт сертификации отечественной биоаналитической лаборатории согласно требованиям GLP.

Ключевые слова: принципы надлежащей лабораторной практики, GLP, неклинические исследования, обеспечение качества испытаний, сертификат соответствия.

EXPERIENCE OF CERTIFICATION BIOANALYTICAL LABORATORY ACCORDING TO REQUIREMENTS OF GOST 33044-2014 «PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE» (GLP)

A.A. Krylatova[1]*, I.E. Shohin[1], E.P. Obrazcova[2], A.O. Monaenkov[2]

Abstract. Certificate of compliance to GOST 33044-2014 "Principles of Good Laboratory Practice" issued by an internationally recognized, competent and independent certification body serves, is one of the criteria for the selection of the contractor and the guarantee of the quality of services provided to many customers, as one of the mandatory conditions and exit organization development at the global, national or sectoral markets. This paper describes the first experience of GLP-certification for Russian bioanalytical laboratory.

Keywords: principles of good laboratory practice, GLP, non-clinical studies, software testing quality, certificate of conformity.

ВВЕДЕНИЕ

Принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP) – это система обеспечения качества, имеющая отношение к процессам организации, планирования, порядку проведения и контролю исследований в области охраны здоровья человека и безопасности окружающей среды, а также оформления, архивирования и представления результатов этих исследований [1].

Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014 устанавливает принципы надлежащей лабораторной практики, предназначенные для применения при проведении неклинических исследований безопасности объектов испытаний, содержащихся в лекарственных средствах, пестицидах, косметической продукции и других объектах. Цель испытаний состоит в том, чтобы получить данные о свойствах объектов испытаний и/или об их безопасности для здоровья человека и/или окружающей среды. Принципы надлежащей лабораторной практики распространяются на неклинические исследования медицинской и экологической безопасности, которые включают в себя исследования, проводимые в лабораторных, тепличных и полевых условиях [1].

В данной работе описывается первый опыт сертификации отечественной биоаналитической и биофармацевтической лаборатории ООО «Центр фармацевтической аналитики» согласно требованиям GLP. Сертификация проводилась Ассоциацией по сертификации «Русский Регистр» в системе Росаккредитации.

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА

Стратегическое решение высшего руководства о разработке системы менеджмента и внедрении в деятельность Центра фармацевтической аналитики принципов и требований надлежащей лабораторной практики было принято в 2015 году. За этот период времени проведен комплекс

организационно-технических мероприятий, нацеленных на расширение объема и спектра проводимых исследований; обеспечение точности, достоверности и качества неклинических исследований. Дополнительно приобретено современное лабораторное оборудование. Создана независимая служба контроля и обеспечения качества проводимых доклинических исследований. Разработаны ключевые документы системы GLP: Руководство по надлежащей лабораторной практике, Положение об испытательном центре, стандартные операционные процедуры (СОП). Все сотрудники ознакомлены с документацией GLP, прошли необходимые тренинги. Разработана и утверждена Программа обеспечения качества ЦФА. Проведены первые внутренние самоинспекции, предусмотренные Программой: инспекция испытательного центра, инспекции отдельных процессов, инспекции отдельных исследований.

Как правило, внедрение и подготовку системы менеджмента к сертификации Организация проводит либо самостоятельно, либо с привлечением внешних консультантов. Подготовка к сертификации системы менеджмента ООО «ЦФА» на соответствие требованиям межгосударственного стандарта ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» включала внешний консалтинг, а также предварительный диагностический аудит.

На подготовительном этапе Организация проводит выбор Органа по сертификации. Здесь можно применять сложные системы рейтингования органов по сертификации, а можно ориентироваться на требования своих потребителей, партнёров или профессиональных ассоциаций. Этап подготовки завершается направлением заявки в Орган по сертификации и подписанием договора на сертификацию.

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ СЕРТИФИКАЦИИ

Первоначальный сертификационный аудит Организаций, заявивших о готовности к сертификации, проводится Органом по сертификации в два этапа:

- 1 этап сертификации — предварительная оценка системы менеджмента, включающая прежде всего анализ документации GLP. Проверяется также комплекс ключевых требований стандарта к организационной структуре Испытательного центра, персоналу, процедурам, процессам и ресурсам системы менеджмента. Организация должна представить руководителю группы аудиторов комплект контролируемых экземпляров действующих документов, описывающих внедренную систему менеджмента. Анализ документации проводится с целью определения адекватности (то есть полноты, степени соответствия, взаимосвязей, отсутствия внутренних противоречий) документов системы менеджмента требованиям заявленного стандарта. Предварительная оценка системы менеджмента имеет целью также определение готовности Организации к сертификации и приверженность её руководства принципам менеджмента качества и GLP. По результатам предварительной оценки руководитель группы аудиторов подготавливает Отчет с рекомендациями по сертификации системы менеджмента, с указанием в нем всех проблемных областей и наблюдений, а также проект плана 2 этапа сертификационной проверки;
- 2 этап сертификации — детальная сертификационная проверка соответствия деятельности Испытательного центра требованиям заявленного стандарта (критериям аудита). Сертификационная проверка должна быть проведена не позднее чем через шесть месяцев после проведения 1 этапа сертификации (предсертификации). Целью проверки является: определение соответствия системы менеджмента Организации, её процессов и рабочих мест всем применимым требованиям заявленного стандарта(ов) и собственным внутренним документам самой Организации, оценка результативности системы менеджмента и ее способности достигать установленных целей в рамках реализации политики, оценка степени выполнения Организацией обязательных законодательных и других регламентирующих требований, относящихся к продукции/услугам. Работы по второму этапу выполняются как в административных помещениях, так и на производственных площадках Организации.

Сертификационная проверка состоит из следующих мероприятий:

A) Вступительное совещание. Представление состава группы аудиторов и экспертов, представление Программы и Плана проверки, краткое изложение методов и процедур, которые будут использованы при проведении проверки и регистрации несоответствий, ответы на вопросы.

B) Проверка соответствия на конкретных рабочих местах. Непосредственно процесс проверки заключается в работе группы аудиторов и экспертов по сбору объективных доказательств посредством наблюдений условий работы, выполнения мероприятий по управлению процессами и обеспечению условий работы в проверяемых подразделениях Организации, опроса, изучения документов и записей для дальнейшего их анализа и оценки.

C) Собрание группы аудиторов, оформление результатов проверки. Перед заключительным совещанием группа аудиторов и экспертов собирается для оформления результатов проверки.

D) Заключительное совещание. Целью заключительного совещания является представление группой аудиторов и экспертов выводов по результатам проверки системы менеджмента Орга-

низации с рекомендациями руководству сертифицирующего органа о признании ее соответствия требованиям заявленного стандарта.

Решение о выдаче сертификата соответствия

Регистрация и оформление сертификата(ов) соответствия осуществляется после устранения несоответствий, выявленных в ходе проведения сертификационной проверки. На это даётся не более трех месяцев. Сертификат соответствия действителен в течение трех лет при условии его подтверждения во время инспекционных проверок.

Надзор за сертифицированной системой менеджмента

Целью инспекционных проверок является установление факта поддержания Организацией системы менеджмента в действии, выполнения положения о непрерывном улучшении, оценка результативности системы менеджмента и определение соответствия деятельности заявленному стандарту и требованиям к системе менеджмента.

Инспекционные проверки проводятся не реже одного раза в год (в особых случаях может быть проведена внеплановая надзорная проверка). Первая инспекционная проверка должна быть проведена не позднее 12 месяцев с момента последнего дня 2 этапа сертификационного аудита. Последующие проверки должны быть проведены в период через ±2 месяца от даты, установленной в отчете по проверке, в случае если плановая проверка не проведена в эти сроки, действие сертификата приостанавливается.

Дополнительные (внеочередные) проверки, так называемые аудиты без заблаговременного уведомления, могут проводиться Органом по сертификации при поступлении жалоб и информации о претензиях к Организации.

Ресертификация

При желании сертифицированной Организации продлить действие сертификата она информирует сертифицирующий орган о желании пройти ресертификацию. Это должно быть сделано не менее чем за три месяца до окончания срока действия сертификата соответствия, и не менее чем за 15 дней до установленного срока подтверждения старого сертификата соответствия. По результатам ресертификационной проверки выдается новый сертификат соответствия.

ОПЫТ ПРОВЕДЕНИЯ СЕРТИФКАЦИИ В ООО «ЦФА»

Сертификационная проверка ООО «ЦФА» на соответствие требованиям надлежащей лабораторной практики GLP (ГОСТ 33044-2014) состояла из следующих этапов:

1. Встреча и беседа с руководством предприятия. На данном этапе рассматривались организационные вопросы проведения исследований, требования к персоналу ООО «ЦФА» и выполнение законодательных требований.
2. Изучались Программа обеспечения качества исследований Организации, распределение ответственности и полномочий.
3. Происходил ознакомительный осмотр помещений ООО «ЦФА», проводилась оценка лабораторных помещений, помещения для тест-систем, архива и условий проведения исследований.
4. Далее проходила оценка выполнения конкретных требований заявленного стандарта, в частности было проверено:

- Положение о представителе руководства, ответственного за соблюдение принципов надлежащей лабораторной практики (GLP).
- Документация об уровне квалификации персонала, образовании, опыте работы и должностных обязанностях специалистов.
- Планирование и выполнение исследовательских работ в соответствии с действующими СОП.
- Наличие и выполнение основного плана-графика.
- Доступность плана исследований, поправок к нему и СОП для специалистов, выполняющих исследование.
- Выполнение Программы качества исследований.
- Внутренний аудит (инспекции).
- Объекты испытаний и стандартные объекты.
- Оборудование, материалы и реагенты.
- Документированная информация, записи, отчеты о проведенных исследованиях.
- Архивирование, хранение материалов о результатах доклинических исследований.

В ходе сертификационного аудита ООО «ЦФА» на соответствие требованиям надлежащей лабораторной практики (GLP) аудиторами были проверены следующие **процессы/элементы** системы менеджмента:

- организация и персонал Испытательного центра;
- процесс планирования, организации и проведения исследований;
- планы и стандартные операционные процедуры (СОП);
- изучение фармакокинетики и статистический анализ результатов;
- обязанности руководителя исследования;
- персонал, выполняющий исследования;
- обязанности службы по обеспечению качества;
- программа обеспечения качества;

- результаты самоинспекций и записи по качеству;
- оборудование, материалы и реагенты;
- объекты испытаний и стандартные объекты;
- применяемые тест-системы;
- Хранение образцов и ЛС;
- управление оборудованием, реагентами, стандартными (эталонными) образцами, калибровочными и контрольными образцами;
- обеспечение расходными материалами;
- проведение неклинических исследований;
- планирование текущего исследования;
- протокол, методы испытаний, первичные записи, журналы;
- отчеты о результатах исследований;
- порядок обращения с отходами;
- организация работы архива;
- хранение материалов завершенных исследований;
- и определено их соответствие требованиям заявленного стандарта.

Также на данном этапе проводились оценка степени внедрения GLP (ГОСТ 33044-2014), соблюдение требований и принципов GLP сотрудниками Центра, в том числе проводились беседы с персоналом, оценка знания документации GLP, СОП и практических навыков.

5. Завершающим этапом было подведение итогов сертификационного аудита и заключительное совещание.

ВЫЯВЛЕННЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

По результатам предварительной оценки (на 1 этапе сертификации) аудиторами было сделано несколько замечаний, наблюдений и выявлены некоторые проблемные области, требующие особого внимания при подготовке ко 2 этапу сертификации. Ниже приводятся некоторые примеры.

Была проведена оценка соблюдения техники безопасности при работе с оборудованием. Предоставлен документ на генератор азота серии S, руководство по эксплуатации, в котором указано, что обслуживающий персонал должен быть знаком с нормативными документами по эксплуатации генератора и правилами техники безопасности.

Наблюдение: персонал ООО «ЦФА», обслуживающий оборудование, не прошел обучение «Правилам устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением. ПБ 10-576-03» и «Правилам устройства и безопасной эксплуатации технологических трубопроводов. ПБ 03-585-03».

Устранение: необходимое обучение было внесено в план-график внешнего обучение персонала, назначен ответственный сотрудник. В установленный срок обучение было успешно пройдено.

При проверке соответствия записей в предоставленных журналах обнаружено, что единица учета реагента «Кислота соляная» («Журнал учета реактивов», в граммах) не соответствует единицам учета реагента «Кислота соляная» («Журнал приготовления растворов», в миллилитрах).

Наблюдение: несоответствие единиц измерения учета реактивов.

Устранение: В «Журнал учета реактивов» были внесены изменения. Произведен пересчет массы реагента на объем с использованием справочных данных.

Ко второму этапу сертификационного аудита все отмеченные аудиторами проблемные области и наблюдения были устранены и не стали несоответствиями на 2 этапе, что было отмечено в итоговом отчете по аудиту.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе сертификационного аудита коллектив ООО «ЦФА» уверенно продемонстрировал знание принципов и требований GLP, их практическое применение в ходе проводимых биоаналитических и научных исследований. Сертификационный аудит был успешно пройден. Система менеджмента ООО «ЦФА» была сертифицирована по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитации). Была установлена область сертификации: научно-исследовательская работа, проведение биоаналитических исследований, проведение фармакокинетических исследований, проведение СТКР (сравнительного теста кинетики растворения).

Наша организация получила колоссальный положительный опыт прохождения сертификационного аудита. Представители организации по сертификации во время прохождения аудита придерживалась принципов объективности и беспристрастности. Также хотелось отметить профессиональную компетентность аудиторов, понимание существующих в организации процессов, готовность обсуждать все проблемы и отвечать на все интересующие вопросы.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. – М.: Стандартинформ, 2015. 16 с.
2. Сертификация систем менеджмента // Ассоциация по сертификации «Русский Регистр». URL: http://www.rusregister.ru/services/ms-certification/ (дата обращения: 29.09.2016).

УДК 615.038

1 – ООО «Центр клинических исследований», 191014, г. Санкт-Петербург, ул. Чехова, 14Б, лит. А

1 – Centre of Clinical Trials. Co Ltd., Chekhova str., 14B, Bd. A, Saint-Petersburg, 191014, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: contact@centre-ct.ru
Тел.: 8 (800) 555 26 29

РЕГУЛЯТОРНАЯ СТРАТЕГИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ КОМБИНИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

К.А. Яценко[1], В.С. Березина[1]*

Резюме. В данной статье, предназначенной как для специалистов по регистрации лекарственных препаратов, так и для специалистов по клиническим исследованиям анализируются проекты основных зарубежных документов, регламентирующих объем регистрационной программы и программы клинических исследований, необходимый для вывода на рынок комбинированных лекарственных препаратов. В статье подробно обсуждается принципиальная возможность создания определенных фиксированных комбинаций, а также приводятся перечни стратегий для клинической разработки комбинированных препаратов, анализируется их применимость в зависимости от ожидаемого эффекта комбинации и приводятся практические рекомендации по выбору дизайна предрегистрационного клинического исследования.

Ключевые слова: клинические исследования, регистрационная стратегия, комбинированные лекарственные препараты, фиксированые комбинации.

REGULATORY STRATEGY OF CLINICAL DEVELOPMENT FOR FIXED COMBINATION MEDICINAL PRODUCTS

K.A. Yatsenko[1], V.S. Berezina[1]*

Abstract. This article is intended for specialists on drug registration and specialists in clinical trials. There are analyzed the main projects of foreign documents regulating the amount of the registration program and the program of clinical trials required to bring to market the combined drugs. Article clarifies the principal possibility for development of certain combination types and gives comprehensive information about different clinical development strategy types of fixed combination medicinal products supported with evaluation of their applicability according to intended claim of the combination. Some practical recommendations for study design selection are also given.

Keywords: clinical trials, clinical development program, fixed combination medicinal products.

ВВЕДЕНИЕ

В сфере разработки стратегии клинической разработки новых препаратов одной из наиболее спорных областей с точки зрения актуальных регуляторных требований и ожиданий фармацевтических компаний является клиническая разработка комбинированных лекарственных средств. Среди российских специалистов бытует множество версий адекватного подхода к исследовательским программам лекарственных комбинаций – от варианта стратегии для воспроизведенного лекарственного препарата до объема разработки, аналогичной оригинальному препарату. Обычно в сложных случаях и в отсутствие явных рекомендаций со стороны российского регулятора рекомендуется прибегать к международному опыту. В данной статье суммированы и подробно обсуждены основные методические подходы, принятые в международном сообществе в отношении разработки комбинированных лекарств. Особое внимание уделено тому, какие препараты считаются комбинированными и как осуществляется их регулирование в разных странах. Кроме того, в данной статье детально анализируется стратегия регистрации лекарственных комбинации и их клиническая разработка.

ПОНЯТИЕ О КОМБИНИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

Под комбинированным лекарственным препаратом понимают препарат, содержащий два или более активных вещества [1]. Различают фиксированные комбинации, представляющие собой два или более активных вещества в фиксированной дозе в общей лекарственной форме, и так называемые наборы (combination packs), представляющие собой совместно упакованные монопрепараты [2].

Разработка комбинированного лекарственного препарата должна строиться на адекватном соотношении рисков и

пользы от совместного применения активных веществ по сравнению с раздельной терапией. Так, пользу от назначения комбинации могут составлять следующие эффекты.

1. Увеличение эффективности комбинации по сравнению с монотерапией за счет синергического эффекта входящих в его состав компонентов.
2. Ускорение наступления эффекта компонентов.
3. Увеличение безопасности при сохранении эффективности на уровне раздельного применения.
4. Эффект, когда один из компонентов нивелирует НЛР (нежелательные лекарственные реакции), вызываемые другим(и).
5. Упрощение терапии, например снижение количества таблеток или увеличение комплаентности.

Применение комбинированного препарата может сопровождаться и определенными рисками. Например, может наблюдаться снижение безопасности в виде увеличения выраженности НЛР (кумулятивная токсичность) или появления дополнительных НЛР (расширение спектра токсичности). Также фиксированная комбинация имеет меньшие по сравнению с раздельным применением возможности для титрации терапевтических доз.

Рассмотрим варианты комбинированных ЛП с точки зрения ФД-эффектов и спектра показаний. Указанный подход используется Европейским медицинским агентством для оценки целесообразности разработки препарата [2].

К допустимым могут быть отнесены следующие комбинации.

- *Комбинации со сходным фармакодинамическим эффектом всех активных веществ, показание к применению которой идентично монокомпонентам.*

Примером такой комбинации может служить препарат, в состав которого входят два различных антигипертензивных вещества – лерканидипин и эналаприл, в показаниях к применению которых значится гипертензия.

- *Комбинированный препарат с действующими веществами с различающимися фармакодинамическими эффектами, его показание к применению отличается от показаний к применению монокомпонентов, но комбинированное использование компонентов терапевтически обосновано.*

Например, фиксированная комбинация парацетамола и буклизина, назначаемая при мигрени, в состав которой включены анальгетик и противорвотное средство, фармакодинамические эффекты которых направлены на купирование различных симптомов мигрени (боль и тошнота).

- *Комбинированный препарат с двумя или более действующими веществами с различающимися фармакодинамическими эффектами и тем же показанием к применению, что и у одного из компонентов; прочие компоненты предотвращают или снижают выраженность побочных эффектов активных компонентов.*

В качестве примера можно привести комбинацию обезболивающего диклофенака и гастропротектора мизопростола, в которой основным показанием к применению комбинации является болевой синдром, а гастропротектор, входящий в составе данной комбинации, призван предупреждать нежелательные лекарственные реакции от назначения НПВС.

- *Комбинация с двумя или более действующими веществами с различающимися фармакодинамическими эффектами и тем же показанием к применению, что и у одного из компонентов; при этом прочие компоненты влияют на фармакокинетические характеристики активных веществ.*

К таким препаратам относятся противопаркинсонические средства, содержащие леводопу и карбидопу: в данном случае прямым противопаркинсоническим действием обладает леводопа, а карбидопа ингибирует периферические рецепторы, участвующие в метаболизме леводопы, и тем самым повышает концентрацию леводопы в ЦНС.

К недопустимым относятся комбинации с двумя или более действующими веществами с различающимися фармакодинамическими эффектами, если при этом указанные компоненты предназначены для терапии ничем не связанных между собой заболеваний. Так, совершенно недопустима разработка контрацептива, содержащего оральный контрацептив и антидепрессант и предназначенного для женщин с клинической депрессией, поскольку клиническая депрессия и контроль репродуктивной функции не являются связанными состояниями.

РЕГУЛИРОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ КОМБИНИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

В российском законодательстве комбинированные препараты упомянуты лишь вскользь. В частности, в федеральном законе № 61-ФЗ комбинированные препараты относятся к отдельным видам лекарственных средств, для них должны быть установлены особенные правила экспертизы, а ускоренная процедура регистрации к ним не применяется [3].

Таким образом, согласно действующему законодательству очевиден особый статус комбинированных препаратов, однако практическая реализация этого статуса пока остается не до конца ясной. Аналогичная ситуация прослеживается в настоящее время и на уровне международного сообщества. Несмотря на то, что Всемирной организацией здравоохранения еще 11 лет назад было создано руководство по регистрации фиксированных комбинаций лекарственных средств [1], разработка детализированных требований к объему и содержанию клинической разработки таких препаратов странами ЕС и США, на которые традиционно ориентируются регуляторы других стран, не завершена.

Так, в 2009 году было опубликовано руководство EMA по изучению комбинированных ЛП, однако в 2012 году его было предложено пересмотреть в свете действующих законодательных норм и с учетом различных сценариев регистрации, рекомендуемых ВОЗ. Новый проект увидел свет ровно год назад, однако его обсуждение до сих пор не завершено и в настоящее время проходит этап редакции в ответ на комментарии представителей индустрии [4]. Кроме того, ряд частных вопросов клинической разработки фиксированных комбинаций, применяемых для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, освещен отдельным документом 2009 года издания [5] вследствие большого количества таких разработок и высокой актуальности проблемы.

FDA также ведет разработку комплексных изменений локального законодательства по комбинированным препаратам. Соответствующий документ был опубликован в декабре 2015 года и еще не прошел стадии публичного обсуждения представителями отрасли [6]. Кроме того, на сегодняшний день в США существует единственный руководящий документ, регламентирующий процедуру регистрации комбинированных антиВИЧ-препаратов, датированный октябрем 2006 года [7].

Таким образом, несмотря на обилие комбинированных препаратов на фармацевтическом рынке и общее понимание международным сообществом особого статуса комбинированных лекарственных средств с точки зрения их регистрационной стратегии, единых действующих детализированных правил регистрации данного типа препаратов пока нет. При подготовке данной статьи основная информация была почерпнута из проектов документов EMA и FDA, а также комментариев к ним.

Стоит также добавить, что ряд положений руководств EMA по исследованию биоэквивалентности и лекарственных взаимодействий также посвящен комбинированным препаратам [8, 9].

Следует особо отметить, что все упомянутые руководства описывают требования к фиксированным лекарственным комбинациям. Конкретные требования к разработке комбинаций в виде наборов ЛС не сформулированы ни одной из стран, и в данной публикации наборы лекарственных препаратов рассматриваться не будут.

Стратегия регистрации фиксированных комбинаций лекарственных средств сформулирована в руководстве Всемирной организации здравоохранения [1]. Согласно рекомендациям ВОЗ регистрационная стратегия должна различаться для 4 типов комбинаций. Первый тип представляет собой воспроизведенные препараты, второй и третий – квазиоригинальные препараты с изученным или неизученным совместным применением входящих в него компонентов соответственно, тогда как четвертый тип – это комбинации оригинального состава. Информация, касающаяся эффективности и безопасности, в составе регистрационного досье для разных типов препаратов представляется в различном объеме. В частности, неизученность или слабая изученность совместного применения препаратов требует подробного обоснования терапевтической целесообразности разработки препарата и тщательного анализа соотношения риск/польза, подробного анализа всех литературных данных, собственных исследований биодоступности и в ряде случаев – биоэквивалентности, собственных доклинических исследований фармакодинамики и безопасности, собственных клинических исследований эффективности и безопасности, постмаркетинговых наблюдений и в ряде случаев – отдельных постмаркетинговых клинических исследований.

Согласно проекту руководства EMA [2] для регистрации фиксированной комбинации ЛП необходимо:

1. Обосновать принципиальную возможность совместного применения активных веществ в выбранной комбинации: возможность заключения в одну лекарственную форму с точки зрения растворимости и прочих физико-химических характеристик, отсутствие влияния компонентов друг на друга не только в составе лекарственной формы, но и в организме человека (образование нерастворимых солей, иные формы инактивации, взаимное влияние компонентов на фармакокинетические показатели и так далее);
2. Предоставить научное обоснование комбинированного назначения активных компонентов, как-то: улучшенное соотношение риск/польза за счет увеличения эффективности и/или безопасности либо повышение удобства терапии по сравнению с раздельным применением препаратов;

3. Обосновать использование каждого из используемых активных веществ при данной патологии. В качестве доказательной базы приводятся результаты доклинических и клинических исследований. Следует обратить внимание на клиническую обоснованность не только выбранных доз, но и концентраций активных компонентов в лекарственной форме. Выбору доз, как и в случае оригинальных лекарственных средств, должно быть уделено особое внимание: в частности, для их обоснования следует использовать жесткие, а не суррогатные конечные точки оценки эффективности;
4. Четко ограничить целевую популяцию пациентов, нуждающуюся в комбинированном препарате, таким образом, чтобы необходимость назначения им комбинированного препарата была очевидной. Для этого могут быть использованы доказательные данные высокой эффективности, подлежащие включению в стандарты лечения; наилучшим доказательством является факт включения компонентов комбинации в действующие стандарты лечения;
5. Описать влияние каждого компонента лекарственного средства, включая вспомогательные, на эффективность, безопасность и/или фармакокинетические и фармакодинамические характеристики активных компонентов.

<u>В качестве научного обоснования могут быть использованы</u>

- Результаты собственных клинических исследований фиксированной комбинации,
- Результаты собственных клинических исследований с использованием монопрепаратов в комбинации, аналогичной по составу комбинированному лекарственном препарату,
- Литературные данные.

Если указанные нормы [2] будут приняты европейским сообществом, есть вероятность, что в нашей стране для их имплементации потребуется менять федеральное законодательство. В настоящее время одной из особенностей наших регуляторных ограничений по проведению клинических исследований является необходимость для спонсора регистрационного клинического исследования быть одновременно владельцем прав на объект исследования или как минимум его доверенным лицом. Таким образом, не будучи держателем регистрационного удостоверения исследуемых монопрепаратов, спонсор клинического исследования их комбинированного применения может либо не получить разрешение Минздрава, либо, заручившись доверенностью одного из держателей регистрационного удостоверения, в дальнейшем рискует лишиться прав на полученные результаты.

Однако следует отметить, что в любом случае такое исследование с использованием монопрепаратов в комбинации будет носить характер пилотного и с высокой вероятностью не будет принято в качестве единственного регистрационного обоснования эффективности и безопасности комбинации, клиническое тестирование которой является обязательным для ее регистрации.

Следует обратить внимание еще на один аспект, который может в дальнейшем оказать влияние на будущие российские правила разработки и регистрации комбинированных лекарственных средств. В разрабатывающейся редакции руководства FDA впервые зарегистрированная фиксированная комбинация лекарственных препаратов получает статус New Chemical Entity (NCE) на 5 лет [6]. Таким образом, срок их патентной защиты, в течение которого разработка биоэквивалентных им препаратов запрещена, составляет 5 лет. Напомним, для аналогичных случаев срок патентной чистоты в РФ составляет 6 лет.

КЛИНИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА КОМБИНИРОВАННЫХ / ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

В руководстве EMA приводится следующая классификация фиксированных комбинаций с точки зрения состава [2]:

- новая комбинация ранее зарегистрированных лекарственных средств;
- комбинация с новым действующим веществом;
- воспроизведенная копия ранее зарегистрированной комбинации.

Вывод на рынок новой комбинации ранее зарегистрированных монопрепаратов вызывает наибольшее число вопросов, так как именно в этой группе препаратов возможно наибольшее количество вариаций состава, видов лекарственного взаимодействия и преимуществ для целевой популяции.

На первом этапе клинической разработки EMA рекомендует оценить необходимость отдельных исследований фармакокинетики на здоровых добровольцах с точки зрения механизмов биотрансформации компонентов препарата, их потенциального фармакокинетического взаимодействия и перспективы применения пациентами особых субпопуляций (например, пациентами с почечной недостаточностью) [2]. Для этой цели компания должна использовать как имеющиеся результаты собственных доклинических исследований, так и литературные данные. Результаты

указанного анализа следует представить регулятору для получения решения последнего о необходимости проведения дополнительных фармакокинетических исследований.

Если, по мнению регулятора, фармакокинетическое исследование необходимо, оно может быть проведено как с участием здоровых добровольцев в формате исследования биоэквивалентности, так и с участием пациентов в составе терапевтических рандомизированных контролируемых исследований в виде фармакокинетического контроля исследуемой терапии.

Клинические исследования фармакодинамики проводятся при отсутствии данных о клинической эффективности и безопасности совместного применения компонентов. При этом для оценки синергии или аддитивности фармакодинамических эффектов компонентов препарата целесообразно использование факториального дизайна.

Проведение клинических исследований эффективности и безопасности рекомендуется осуществлять по одной из трех предложенных ВОЗ [1] и адаптированных EMA [2] стратегий.

Согласно **первой стратегии** в клиническое исследование включаются пациенты с плохим или отсутствующим откликом на терапию одним из монопрепаратов, входящих в состав фиксированной комбинации. Исследование проходит в 2 стадии, исследуемая комбинация используется для улучшения отклика пациентов на терапию путем перевода той части общей популяции пациентов, для которых показан плохой отклик, с терапии монопрепаратом на терапию фиксированной комбинацией. Таким образом, рандомизация проводится в начале второй стадии, в итоге начинается тестирование гипотезы превосходства комбинации над компонентом, на терапию которым наблюдался слабый отклик.

Стратегия предусматривает тестирование всех регистрируемых дозировок, при этом при достаточном фармакокинетическом и фармакодинамическом обосновании возможно сокращение объема испытаний с использованием метода брекетинга, то есть исследования самой большой и самой малой из всего диапазона дозировок.

Если по данным клинической фармакодинамики дополнительные активные вещества влияют на уровень эффективности комбинации, желательно изменить дизайн таким образом, чтобы иметь возможность оценить собственный эффект дополнительных активных компонентов, то есть проводить исследование в большем количестве параллельных групп.

Вторая стратегия предусматривает перевод части пациентов, уже получающих терапию монопрепаратами, входящими в состав фиксированной комбинации, на прием комбинации. Естественно, такой дизайн может быть применим только в случаях, когда комбинированное назначение монопрепаратов является устоявшейся клинической практикой и обосновано с точки зрения принципов доказательной медицины, например установлено, что использование только одного монопрепарата из комбинации характеризуется плохим откликом целевой популяции на лечение (см. стратегию 1). При выборе гипотез спонсор выбирает между неменьшей эффективностью или эквивалентностью.

Третья стратегия – использование принципиально новых терапевтических схем – включает в себя целую группу подходов, выбор которых обуславливается свойствами регистрируемой комбинации:

1. В случае, когда комбинированный препарат по предварительным данным обладает большей эффективностью по сравнению с монопрепаратами, исследование проводят в 3 группах пациентов, при этом тестируется гипотеза превосходства терапии фиксированной комбинацией по сравнению с терапией отдельными монопрепаратами. Результаты клинического исследования можно считать успешными, если при более высоком ответе на терапию в группе исследуемой комбинации была показана приемлемая безопасность. Разумеется, критерии такой приемлемости должны быть определены протоколом заранее.
2. Если комбинированный препарат характеризуется большей скоростью наступления эффекта по сравнению с монопрепаратами, особое внимание должно быть уделено именно показателю скорости. Для этой цели в статистические критерии оценки эффективности вводится оценка так называемого «времени дожития» или времени до наступления анализируемого события. При этом исследуемая комбинация должна показать не меньшую эффективность по сравнению с монотерапией, а временная точка оценки эффективности устанавливается таким образом, чтобы в это время уже было отмечено достижение целевого эффекта во всех группах сравнения. Так же, как и в предыдущем случае, при планировании исследования необходимо разработать критерии приемлемости оценки безопасности, достижение которых будет условием регистрации комбинированного препарата. Пациенты в таком исследовании могут быть разделены на 2 или 3 группы в зависимости от свойств компонентов: например, если в двухкомпонентном комбинированном препарате одно из активных веществ носит характер исключительно ускорителя эффекта другого ак-

тивного вещества, создание группы, принимающей только этот ускоритель, не имеет терапевтической и научной целесообразности.

3. Если пациенты целевой популяции малочувствительны к терапии монопрепаратом, но есть основания полагать, что его комбинирование с другим веществом приведет к повышению эффективности, исследование проводят в 2 группах, тестируя гипотезу превосходства терапии фиксированной комбинацией по сравнению с терапией отдельным монопрепаратом. Успех исследования подтверждается более высоким эффектом и приемлемым профилем безопасности комбинации. Эта стратегия во многом идентична стратегии 1, однако не предусматривает предварительного ведения всех пациентов на монотерапии, так как такая стадия была бы неэтичной при априорном предположении о малой эффективности монотерапии.

4. В случаях, когда разработка комбинированного препарата нацелена на достижение лучшей безопасности терапии целевой популяции, одной из тестируемых гипотез должна быть гипотеза превосходства безопасности комбинированной терапии по сравнению с терапией монопрепаратами. В качестве конечных точек следует выбирать частоту встречаемости и выраженность специфических нежелательных лекарственных реакций, установленных для монопрепаратов. Другой тестируемой гипотезой становится гипотеза не меньшей эффективности комбинации по сравнению с монопрепаратами. Таким образом, в исследовании должна быть обеспечена достаточная мощность для проверки обеих гипотез. Обычно количественная оценка безопасности требует значительных выборок, поэтому в качестве конечных точек оценки безопасности целесообразно выбирать нежелательную лекарственную реакцию с установленной большой частотой их выявления при терапии монопрепаратами. Количество исследуемых групп в данном случае зависит от свойств комбинации. Например, если в двухкомпонентном комбинированном препарате одно из активных веществ выступает в качестве усилителя безопасности и не оказывает собственного терапевтического эффекта в отношении целевой патологии, для оценки достаточно 2 групп – основного монопрепарата и комбинации. Однако часто комбинирование двух и более эффективных компонентов приводит к возможности использования их в субтерапевтических дозах для достижения целевого эффекта. В этом случае весьма вероятно снижение числа специфичных для них нежелательных лекарственных реакций. Для подтверждения этого пациентов рандомизируют на группы по числу компонентов + 1, а тестирование гипотезы превосходства комбинации по безопасности осуществляют в отношении каждого активного вещества. Критериями успеха такого исследования является сочетание приемлемого (то есть не худшего) терапевтического эффекта комбинированного лекарственного средства с достоверным лучшим уровнем его безопасности по сравнению с монотерапией.

5. Наконец, если один из компонентов регистрируемой комбинации улучшает фармакокинетические или фармакодинамические свойства другого активного вещества, но при этом не обладает собственным терапевтическим эффектом в отношении целевой патологии, исследование проводится в 2 группах пациентов. При этом в зависимости от особенностей влияния такого фармакокинетического или фармакодинамического взаимодействия на эффективность, могут тестироваться гипотезы превосходства эффекта комбинации над монопрепаратом или не меньшей эффективности комбинации по сравнению с монопрепаратом с одновременным анализом времени до наступления целевого эффекта. По оценке исходов такое исследование будет похоже на один из двух первых описанных выше вариантов.

Для всех описанных выше случаев всех трех стратегий клинической разработки новой комбинации ранее зарегистрированных лекарственных средств будут справедливы следующие замечания:

А) Если регистрируемая комбинация характеризуется более широкими по сравнению с исходными монопрепаратами, показаниями к медицинскому применению, для каждого такого показания должны быть проведены отдельные клинические исследования с включением всех описанных в инструкции популяций. При этом программа клинической разработки должна включать обоснование терапевтических доз, в том числе путем проведения отельных дозоопределяющих клинических исследований. В регистрационном досье отдельно должна быть приведена доказательная база синергизма компонентов в отношении показателей эффективности и/или безопасности нового лечения, состоящая как из самостоятельно полученных данных, так и данных из литературных источников.

Б) Назначение комбинированного препарата может проходить с изменением режима назначения его компонентов, например отличаться по исходно рекомендованному времени назначения как минимум для одного из компонентов. Так часто происходит, когда исходные монопрепараты назначаются с одинаковой кратностью, но в разное время суток: например, препарат А – утром, препарат Б – вечером, а их фик-

сированная комбинация АБ – утром. В таком случае обязательны дополнительные исследования биоэквиалентности фиксированной комбинации комбинированной терапии отдельными препаратами, а также сравнительная клиническая оценка фармакодинамики в аналогичных группах.

В) Клиническая разработка более сложного случая, когда исходные монопрепараты отличаются друг от друга и по времени, и по кратности назначения, помимо указанных задач, должна решать задачу оценки безопасности изменения режима дозирования. При этом в обоих случаях пациенты исследуемых групп, получающие монотерапию, придерживаются режима дозирования, установленного в инструкции по медицинскому применению монопрепаратов.

Описанные выше рекомендации относились к клинической разработке фиксированных комбинаций двух или более изученных монопрепаратов. Если же регистрируемый препарат содержит в качестве активного хотя бы одно *ранее не зарегистрированное вещество*, для такого вещества должны быть проведены отдельные исследования, которые позволят полностью охарактеризовать его фармакокинетику (включая собственную биотрансформацию у здоровых пациентов и в профильной популяции и взаимодействие с остальными компонентами фиксированной комбинации), фармакодинамику (с позиций эффективности, безопасности и лекарственного взаимодействия), а также собственную эффективность и безопасность. Остальные требования к клинической разработке такого препарата аналогичны описанным выше требованиям.

Наиболее простой представляется разработка *воспроизведенной копии ранее зарегистрированного комбинированного препарата*. Для такой комбинации исследования фармакодинамики и клинической эффективности и безопасности не требуются [2]. Необходимо доказать биоэквивалентность комбинации референтному комбинированному препарату по всем действующим веществам в ее составе. Следует отдельно отметить, что позиция EMA недвусмысленно ставит в приоритет данные биоэквивалентности для воспроизведенных копий для последующей их регистрации: в случае неуспеха исследования биоэквивалентности воспроизведенной комбинации ее последующая регистрация невозможна даже при удовлетворительных результатах клинического исследования терапевтической эквивалентности референтному препарату [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно текущей позиции зарубежных регуляторов стратегия регистрации и клиническая разработка фиксированных комбинаций лекарственных препаратов существенно различаются по сути, объему и полноте необходимых к проведению исследований в зависимости от характеристик регистрируемой фиксированной комбинации. Оригинальность состава фиксированной комбинации, ее предполагаемое влияние на соотношение риск/польза, а также обоснованность данных о фармакокинетическом и фармакодинамическом взаимодействии компонентов фиксированной комбинации являются решающими факторами, определяющими возможность сокращения или необходимость расширения программы клинических исследований, равно как возможность замены собственных исследований на анализ данных литературы.

ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Annex 5. Guidelines for registration of fixed-dose combination medicinal products Technical Report Series, № 929, 2005.
2. Guideline on clinical development of fixed combination medicinal products. EMA/CHMP/281825/2015.
3. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ в редакции от 03.07.2016
4. EMA/CHMP/281825/2015/ Submission of comments on 'Draft guideline on clinical development of fixed combination medicinal products. URL: http://www.efpia.eu/uploads/EFPIA_comments_Gdle_fixed_combination_final.doc (дата обращения 10.10.2016).
5. COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP), Questions and Answers Document on the Clinical Development of Fixed Combinations of Drugs belonging to different therapeutic classes in the field of cardiovascular treatment and prevention, CHMP/EWP/191583/2005
6. Food and Drug Administration, Fixed-Combination and Co-Packaged Drugs: Applications for Approval and Combinations of Active Ingredients Under Consideration for Inclusion in an Over-the-Counter Monograph. Federal Register. Т. 80. № 246. С. 79776 – 79795.
7. FDA CDER, Fixed Dose Combinations, Co-Packaged Drug Products, and Single-EntityVersions of Previously Approved Antiretrovirals for the Treatment of HIV. Procedural 2006.
8. EMA CHMP, Guideline on the Investigation of Drug Interactions CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr.
9. EMA CHMP, Guideline on the investigation of bioequivalence CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr**

АНАЛИТИКА
ЭКСПО

15-я Юбилейная международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

11-13 апреля 2017 года
Москва, КВЦ «Сокольники»

Организатор
Группа компаний ITE
+7 (499) 750-08-28
analitikaexpo@ite-expo.ru

Забронируйте стенд на сайте
analitikaexpo.com

УДК 614.27; 615.11

1 – ГБОУ ВПО
Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова
Минздрава России, 119991,
Россия, г. Москва,
ул. Трубецкая, 8

1 – I.M. Sechenov
First Moscow State
Medical University, 8,
Trubetskaya str., Moscow,
119991, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: betula73@yandex.ru,??? zelixon1930@yandex.ru (в прошлом номере)

АПТЕЧНОЕ ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВО В РОССИИ XVIII–XIX ВЕКОВ: ПЕРВЫЕ РУССКИЕ ФАРМАКОПЕИ, АПТЕКАРСКИЕ УСТАВЫ

Ю.И. Зеликсон[1]*

Резюме. В статье дан обзор российского аптечного законодательства XVIII–XIX веков: описаны первые русские ведомственные и государственные фармакопеи (1756, 1778, 1798 гг.). Приведен анализ Аптекарского устава первого (1789 г.) и второго изданий (1857 г.), приведены выдержки из аптекарских уставов, отражающие требования того времени к квалификации, моральному облику, ответственности аптекаря, к условиям изготовления и отпуска лекарств.

Ключевые слова: история фармации, регламентация изготовления лекарственных средств, фармакопеи, Аптекарский устав.

PHARMACEUTICAL LEGISLATION IN RUSSIA IN XVIII–XIX CENTURIES: THE FIRST RUSSIAN PHARMACOPOEIA, APOTHECARY STATUTES

Yu.I. Zelikson[1]*

Abstract. The article gives an overview of the Russian pharmaceutical legislation in XVIII–XIX centuries and describes the first Russian departmental and government pharmacopoeia (1756, 1778, 1798). There is analyses the first Apothecary statue (1789) and the second Apothecary statue (1857). It is got experts from Apothecary Statues that reflecting the requirements of the time to the qualification, morals, responsibility of the pharmacist to the manufacturing and dispensing drugs.

Keywords: history of pharmacy, regulation of the manufacture and dispensing drugs, pharmacopeia, Apothecary Statue.

ВВЕДЕНИЕ

Материалы по аптечному законодательству XVIII века изучил и представил в хронологическом порядке В.М. Сало [1]. В их числе – указы об открытии в Москве частных аптек, о запрещении торговли в зелейных и москательных лавках ядовитыми и другими лекарствами.

В 1763 г. вышел указ об учреждении Медицинской коллегии, которой поручалось, в частности, упорядочить значительно устаревший арсенал лекарственных средств, «и для того завести и учредить диспенсаторию Российскую постоянную и во всей России одну».

Истории русских фармакопей XVIII века посвящены работы С.П. Фортунатова, А.М. Филькина, А.Г. Натрадзе и других исследователей.

В 1765 г. в Санкт-Петербурге была опубликована первая печатная русская фармакопея. Это была военная фармакопея – «Pharmacoroea castrensis». Она являлась фрагментом большого фармакопейного труда, выполненного еще в конце 50-х годов XVIII века группой русских врачей по инициативе, под руководством и при активном участии тогдашнего архиатера (руководителя всего медицинского дела в России) П.З. Кондоиди.

Цели издания этой первой русской фармакопеи были сформулированы в специальном указе медицинской коллегии: «... *дабы потребные воинским командам и людям медикаменты и прочие вещи отпускаемы были без излишества, сообразуясь настоящей нужде и прямому их действию и избегая колико можно употребления дорогих вещей, особливо же иностранных*» [2].

В 1778 г. была выпущена напечатанная на латыни государственная фармакопея Pharmacoroea Rossica (автор не установлен), основу которой составляли отечественные растительные средства. Для сложных препаратов приводилось описание методов их изготовления. Были предприняты *первые* попытки определения доброкачественности лекарств.

Много сделал для разработки отечественных фармакопей русский ученый XVIII века Н.М. Максимович-Амбодик (1741–1812), основоположник медицинской ботаники и фитотерапии в России. Его труды «Врачебное веществословие» (СПб., 1783–1789), «Ботаники первоначальные осно-

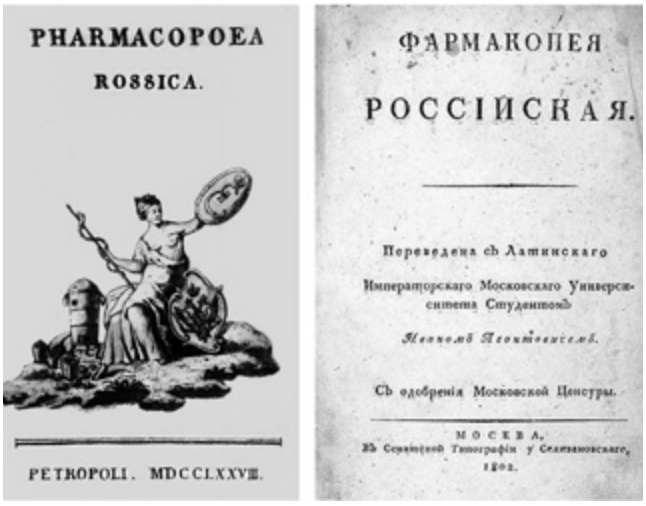


Рисунок 1. Слева: титульный лист первой русской гражданской фармакопеи на латинском языке (1778) [3]; справа: первое издание фармакопеи на русском языке (пер. с лат. И. Леонтовича. М.: Сенатская типография у Селивановского, 1802. 376 с. 20×12 см) [4]

вания» (СПб., 1795) и «Новый ботанический словарь» (СПб., 1795–1804; 2-е изд., СПб., 1808) содержали богатейший материал по вопросам ботаники, фармакогнозии и фармакотерапии. Большая заслуга Максимовича-Амбодика состоит также в разработке ряда новых медицинских и ботанических номенклатур на русском языке [5].

Дальнейшее развитие науки, расширение ассортимента лекарств, увеличение числа аптек требовали обновления фармакопеи, и в 1798 г. была издана новая фармакопея – Pharmacopoea Rossica (автором ее являлся Н. Карпинский), также на латинском языке. Статьи этой фармакопеи имели регламентированную структуру и были значительно шире, чем статьи фармакопеи 1778 г. Многие монографии содержали указание о способах очистки лекарственных средств от примесей, а также признаки их доброкачественности. Имелись первые обобщения, ставшие прообразом общих статей, которые появились в позднейших фармакопеях. Фармакопея 1798 г. заложила основу для последующих изданий русских фармакопей [6–10]; в 1802 г. был издан ее перевод на русский язык [11].

Для определения состава неизвестного лекарства и для контроля за качеством лекарств необходимы были химические методы анализа. Возникновение химического анализа в России тесно связано с работой аптек. Первые аналитические работы проводились алхимистами в аптеках. Анализ лекарств и различных веществ в аптеках и пробирных лабораториях способствовал возникновению и развитию фармацевтического анализа и аналитической химии в России [12]. Первое руководство по фармацевтическому (качественному) анализу написал академик В.М. Севергин [13].

Во второй половине XVIII века появились первые русские ведомственные и государственные фармакопеи, которой упорядочили ассортимент лекарств, упростили рецептуру и максимально использовали отечественные лекарственные средства. Эти фармакопеи были оригинальными и самобытными. Они составлялись на основе достижений отечественной науки и состояния производства лекарств в России. В них обобщен опыт русской, в том числе народной, медицины.

АПТЕКАРСКИЕ УСТАВЫ

Первый аптекарский устав и первая печатная аптекарская такса были изданы в 1789 г. Энциклопедический лексикон давал следующее определение: «*Аптекарский Устав есть законоположение, коим с точностью определяются обязанности аптекаря и прочих фармацевтов, касательно управления аптекой, их ответственностью перед правительством и отношения к публике*».

В первых двух статьях устава приводились требования к квалификации и моральному облику аптекаря.

Статья 1: «*Каждая аптека в российском государстве должна быть управляема мужем отличным и государственной медицинской коллегией в фармацевтическом знании испытанным и удостоенным*».

Статья 2: «*Аптекарь, яко добрый гражданин, верно хранящий присяжную должность, повинен быть искусен, честен, совестен, благоразумен, трезв, прилежен, во всякое время присутствен и исполняющий звание свое к всеобщему благу соответственно*».

Аптекарь был обязан обеспечивать качество лекарств.

Статья 3: «*Аптекарь должен иметь добрые, свежие, к употреблению годные и расходу соразмерные*

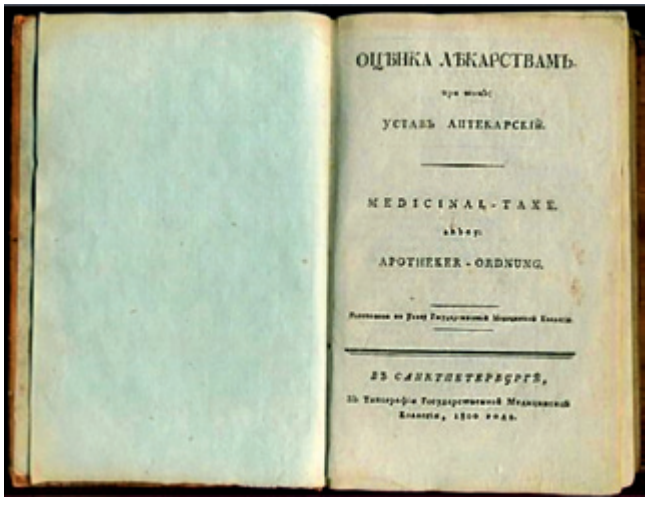


Рисунок 2. Монография «Оценка лекарствам при том устав аптекарский» 1800 г. [14]

припасы и из таких приуготовлять потребные сложные лекарства в таком только количестве, чтобы оные, паче чаяния испортившись, не причинили ни самому убытку, ни вреда ближнему».

Государство заботилось о том, чтобы труд аптекаря не был убыточен.

Статья 4: «*Дабы аптекарь, употребляя необходимые издержки и труды на изготовление запасов, не понес убытка, то наблюдаемо будет, чтобы нигде, никто кроме аптек, лекарства в раздробь не продавал».*

Предъявлялись высокие требования к санитарному режиму аптеки.

Статья 5: «*Дабы аптека в добром состоянии содержима была, должен аптекарь соблюдать во всем отменную чистоту, как в наружности, так особливо в сосудах, лекарства содержащих. Материальная камера должна быть, сверх опрятности, так расположена, чтобы ни сырость, ни сушь вещам вредить не могла, а лаборатория запасена всем тем, что для исправного аптекаря потребно».*

Аптекарь отвечал за квалификацию сотрудников.

Статья 6: «*Аптекарь повинен прилежно смотреть за провизором, подмастерьями и учениками, чтобы успевали в фармацевтической науке и должность свою исполняли совершенно. Для вящей же общества к аптекам доверенности, не должен аптекарь принимать в услужение ни провизора, ни гезеля, который государственной медицинской коллегией или определенным на то штадт-физиком во своем звании не одобрен».*

Аптекари должны были придерживаться указаний фармакопей.

Статья 7: «*Всякий аптекарь должен иметь правилом российскую диспенсаторию, pharmacopoea rossica, по оной материалы запасать и лекарства составлять».*

Статья 8: «*Но как в России, наипаче в столичных городах, разные суть врачи иностранные, приобыкшие предписывать лекарства по другим диспенсаториям, то аптекарь может и по тем делать приуготовление и отпуск, а чтоб цена и таковым была обществу известна, для того единственно и внесены в российскую таксу».*

Подчеркивалась ответственность аптекаря за точность изготовления лекарств и предотвращение ошибок.

Статья 9: «*Аптекарь повинен иметь крайнее старание, чтобы лекарства составляемы были вещами и весом точно по предписанию врача, дабы отвращена была всякая погрешность, подвергающая больного здоровье и жизнь опасности, а врача доброе имя безславию».*

Статья 10: «*По неясному рецепту, или в коем вес лекарствам покажется сомнительным, аптекарь не должен приуготовлять лекарство, пока, снесясь, не получит от врача надлежащего объяснения».*

Статья 16: «*Аптекарь не должен отпускать лекарства по рецептам, прописанным докторами, штаб-лекарями или лекарями, не получившими дозволения отправлять практику».*

Статья 17: «*По требованиям присяжных бабок дозволяется во время только родов, для родительниц и новорожденных младенцев отпускать не сильнодействующие, но самые легкие и безопасные лекарства, както миндальное масло, коричную воду, розмаринную траву, ревенный сироп и сему подобное. Кроме таковых обстоятельств, отпуск лекарств по требованиям бабок вовсе запрещается».*

Особую осторожность следовало соблюдать при отпуске ядовитых веществ.

Статья 18: «*Вещи ядовитые содержать аптекарю под собственным своим хранением за замком и печатью и отпускать оные по требованию самому; при отпуске для отвращения могущего последовать какого-либо несчастья, иметь письменный вид сведение, кому именно и на что требуется, и по таковым удостоверении, взять от присланного в получении расписку, отпускать».*

Статья 19: «*Аптекарям предписывать для больных лекарства и лечить оных запрещается».*

Аптекарям запрещалось также изготовлять и продавать спиртные напитки.

Статья 20: «*Аптекарь по просьбам посторонних людей водку двоить ни из хлебного вина, ни из виноградного не должен и повинен накрепко смотреть, чтобы и его подчиненные того не делали».*

Статья 21: «*Аптекарь хлебного и виноградного вина, или иного какого нелекарственного питья ни чарками, ни кружками, ни ведрами, ни бочками продавать и тем питьем торговать не должен».*

Предписывалось учтивое отношение к инспекторам, проверяющим аптеку.

Статья 22: «*При осмотре аптеки губернским или уездным физиком, или где аптекаря нет, провизор должен оному за все отвечать благопристойно».*

Деятельность аптекаря оценивалась государственной медицинской коллегией.

Статья 23: «*Аптекарь, звание свое исправно и верно исполняющий, будет пользоваться от государственной медицинской коллегии соответствующим пок-*

ровительством; нерадивый же и верности не сохранивший, как член общества вредный, восчувствует точную строгость закона» [15].

АПТЕКАРСКИЙ УСТАВ 1857 г.

Аптекарский устав (по Своду законов Российской империи, т. XIII, изд. 1857 г.) приведен в руководстве Н. Неезе [16].

Этот устав характеризуется преемственностью и развитием основных положений Аптекарского устава 1789 г.

В разделе «*Внутреннее устройство аптек*» указывалось, в частности, что аптека должна быть снабжена Российской, Российской военной и Берлинской фармакопеями *«и некоторыми лучшими сочинениями по части фармации и химии*».

Весы и разновес в аптеке должны быть клейменными, за исключением маленьких весов с коромыслом менее шести вершков (26,4 см) и гирек менее одной унции (30 г).

Подробные правила и меры взыскания за их нарушение излагались в разделе «Порядок внутреннего управления аптек, заготовления и отпуска лекарств».

Лекарства по рецептам должны изготовляться «*во всякое время без промедления, по порядку и очереди вступления оных в аптеку. Рецепты, на коих означено врачом: statim, cito или citissime, удовлетворяются без малейшего отлагательства преимущественно перед прочими. Виновные в медленном отпуске лекарств подвергаются взысканию. Управляющий аптекой, за недосмотр, подвергается каждый раз взысканию 5 рублей, а виновный в том фармацевт взысканию 1 рубля 50 коп.*».

Большое внимание обращалось на предотвращение фармацевтической несовместимости и передозировки сильнодействующих лекарств: «*Если в рецепте замечена будет какая-либо неясность или сомнение на счет смешения разных составляющих лекарства, либо количества сильнодействующих веществ, то содержатель аптеки или управляющий оной, остановясь исполнением, входит в объяснение с врачом и отпускает лекарство не прежде, как по получении утвердительного письменного отзыва... Виновные в отпуске лекарств по сомнительным или неясным рецептам... подвергаются взысканиям и наказаниям*».

Были предусмотрены взыскания за нарушения правил оформления изготовленных лекарств к отпуску.

«*Если из аптеки будут отпущены по рецептам лекарства или без сигнатур, или же надлежащим образом незакупоренные, незавязанные или незапечатанные, или же без соблюдения других для отпуска лекарств предписанных правил, то управляющий за недосмотр, и виновный в том фармацевт подвергаются взысканию...*»

Сурово, вплоть до отстранения от должности, наказывались работники аптек за отпуск лекарств по копиям рецептов или по сигнатуре без подписи врача, если в их состав входили сильнодействующие вещества.

Вещества ядовитые и сильнодействующие разделяли на четыре разряда, «*смотря по большой или меньшей их опасности для здоровья и жизни людей, необходимости для технического или исключительно для фармацевтического употребления и по степени их доступности для народа…*

За несоблюдение должной осторожности при хранении, отпуске или употреблении веществ не только ядовитых, но и сильнодействующих, управляющий аптекой подвергается лишению навсегда права управлять аптекой, и буде он сам содержатель, то и права содержать оные; управляющие казенными аптеками за сие отрешаются от должности».

В аптеках запрещалось изготовление и отпуск всякого рода секретных лекарств (*arcana*), исключая одобренные Медицинским советом, и спиртных напитков.

«*Управляющий аптекой, изобличенный в выделке водок, ликеров и других предметов питейной продажи в своей аптеке, подвергается за сие: в первый раз денежному взысканию от 50 до 100 рублей, а второй раз от 100 до 500 рублей, в третий раз он лишается навсегда права управления аптекой, а если он сам содержатель, то права содержать аптеки. Найденные у него водки и другие предметы питейной продажи конфискуются*».

В разделе «Права и обязанности фармацевтов» регламентировались меры по обеспечению надлежащего качества лекарств.

«*Содержатели аптек или и управляющие оными должны быть честного и незадорного поведения и строго соблюдать:*

1. *Чтобы подчиненные им фармацевты должность свою исправляли исправно, вели себя хорошо и с приходящими обходились вежливо, а ученики успевали в фармации.*
2. *Чтобы аптека снабжена была свежими и к врачебному употреблению годными материалами и припасами в количестве, соразмерном расходу, равно всеми нужными фармацевтическими и химическими аппаратами и посудой, которая должна быть содержима в чистоте, медная же вылужена.*
3. *Чтобы как простые, так и сложные медикаменты и составы приготовляемы были по фармацевтическим правилам, а из числа сложных лекарств в запас заготовлялись только те, кои не могут портиться от времени.*

4. *Чтобы составные лекарства ни в каком случае не были для аптеки покупаемы у фабрикантов или материалистов [оптовых торговцев], но приготовлялись в аптечной лаборатории, кроме разве таких, кои с выгодой изготовляются только в самых больших количествах.*

5. *Чтобы лекарства по рецептам составляемы были из неповрежденных веществ, качеством и весом точно по предписанию врача, а самый отпуск производился без всякого замедления порядком вышеизложенным, и не был допускаем по рецептам лиц, не получивших дозволения на врачебную практику, либо фельдшеров, и тоже чтобы не было ошибочно отпущено одно лекарство вместо другого.*

6. *Чтобы лекарства приготовляемы были в чистых и невредных здоровью сосудах…*»

В чрезвычайных случаях фармацевт мог и должен был оказывать скорую медицинскую помощь. «*Фармацевтам запрещается прописывать лекарства и заниматься лечением больных, кроме впрочем чрезвычайных случаев, как например, при отравлениях, задушении, угаре, кровотечениях, обжоге и т.п. происшествиях, когда требуется скорая помощь, а в близости нет врача. До прибытия его фармацевт может отпустить нужное лекарство и научить употреблению его*».

Работники аптеки, допустившие ошибки с тяжелыми последствиями, могли быть преданы уголовному суду. «*Но когда от допущенной в аптеке ошибки могли бы случиться опасные последствия или действительно произошел вред здоровью употреблявших неправильно приготовленное лекарство, или даже последует кого-либо смерть, тогда виновный аптекарь, провизор или аптекарский помощник, по рассмотрении дела в Медицинском Совете, предается уголовному суду… Если от допущенной в аптеке ошибки последует кому-либо смерть, то виновные, сверх определенных за такие упущения взысканий или наказаний, подвергаются, буде они христиане – церковному покаянию по распоряжению своего духовного начальства*».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Так в XVIII веке сформировалось российское аптечное законодательство. Появились первые русские ведомственные и государственные фармакопеи. Основным документом, впервые сформулировавшим принципы нормирования деятельности аптек, стал Аптекарский устав 1789 г., его постулаты получили свое развитие в Уставе 1857 г. Приведенные в статье цитаты из этих документов свидетельствуют о том, что главные требования к изготовлению лекарств, сформулированные в 18 столетии, не менее актуальны и в XXI веке с учетом множества поправок и формулировок, связанных с развитием науки и производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. В.М. Сало. Аптечное законодательство в России в XVIII веке // Фармация. 1982. Т. 31. № 3. С. 66–67.
2. В.А. Невский. По поводу статьи проф. Д.М. Российского «Первые русские фармакопеи и их предшественники» // Фармакология и токсикология. 1952. № 1. С. 60–63.
3. Ссылка: Фармакопея фото. URL: http://medicfoto.ru/post.php?id=12273 (дата обращения 25.10.2016).
4. Петербургская антикварная кунсткамера. URL: https://bidspirit.com/portal/#!/lotPage/source/catalog/auction/54 (дата обращения 25.10.2016).
5. Д.М. Российский. Первые русские фармакопеи и их предшественники: доклад на конференции, посвященной Государственной фармакопее, VIII изд. 9–11 июня 1949 г. // Фармакология и токсикология. 1950. № 1. С. 43–49.
6. А.Г. Натрадзе. Русские и советские фармакопеи. – М., Медицина. 1978. С. 17–44.
7. С.П. Фортунатов. Из истории создания первых российских фармакопей // Аптечное дело. 1952. Т. 1. № 3. С. 65–71.
8. С.П. Фортунатов. Материалы к истории первых фармакопей // Аптечное дело. 1953. Т. 2. № 3. С. 42–45.
9. С.П. Фортунатов. Изучение и использование отечественных лекарственных растений в XVIII веке // Аптечное дело. 1954. Т. 3. № 1. С. 44-50.
10. С.П. Фортунатов. Самобытный характер русских фармакопей XVIII века: автореф. дис. … канд. фарм. наук. – М., 1955.
11. Фармакопея Российская. – М., 1802. 376 с.
12. Н.А. Кудакова. Некоторые данные о возникновении контроля качества лекарственных веществ на Руси // Аптечное дело. 1953. Т. 2. № 5. С. 53–55.
13. В.М. Сало. Фармацевтический анализ в России в первой половине XIX века // Фармация. 1974. Т. 23. № 2. С. 73–76.
14. Петербургская антикварная кунсткамера. URL: http://antique-kunstkamera.ru/catalog/antiquarian-book/knigi-do-1801/403.html (дата обращения 25.10.2016).
15. Н.В. Варадинов. Аптекарский устав. – СПБ., 1880. С. XXXII–XXXV.
16. Н. Неезе. Фармация для фармацевтов и врачей. – СПБ., 1862. С. 205–209.

Федеральная сеть сервисных центров «Фармконтракт»

В рамках клиентского сервиса Вы получаете следующий комплекс услуг по техническому обслуживанию оборудования ведущих мировых производителей:

Инсталляция, IQ/OQ/PQ квалификационные работы и калибровка оборудования в соответствии с требованиями нормативов USP, FIP и GMP

Составление досье на оборудование

Сервисное обслуживание: настройка, поверка и калибровка, валидация, аттестация и идентификация оборудования

Обучение персонала работе на новых моделях оборудования, правилам текущего ремонта и обслуживания

Разработка методик анализа и их установка на конкретную модель прибора заказчика

Метрологическое обслуживание средств измерений

Гарантийное и пост гарантийное обслуживание оборудования от сертифицированных сервисных инженеров

Валидация чистых помещений

«Фармконтракт Сервис» - авторизованный сервисный центр

büchiglasuster · SKALAR · BUCHI · SYSTAG · ESCO · METTLER TOLEDO · NATOLI
SCHMIZO · INTEGRA · ERWEKA · Agilent Technologies · CHRIST · Julabo · BINDER
Miele PROFESSIONAL · Nabertherm · cisa · INFORS HT · MERCK · IKA · sigma
sotax · pharmatron · SEJONG · Whatman · Metrohm · ThermoFisher SCIENTIFIC · THALESNANO

РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ

Всегда в наличии всегда расходные материалы и запчасти для оборудования, задействованного в процессах:

- анализа и испытаний при создании, производстве и контроле качества фармацевтических и ветеринарных препаратов;
- диагностических и экспертных исследований в области клинической и судебной медицины, токсикологического и экологического анализа

**О наличии товара на складе уточняйте у менеджеров*

+7 (499) 674-09-45 (центральный офис в Москве) 8 (800) 333-93-92 (бесплатный звонок) info@phct-service.ru wwwphct-service.ru

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК CYTELL™

Материал предоставлен компанией GE Healthcare

АННОТАЦИЯ

Для изучения влияния химических веществ на нарушение клеточного цикла у млекопитающих человеческие клеточные линии HeLa (ATCC) были подвергнуты воздействию противоопухолевого препарата нокодазол[1] (Sigma-Aldrich), который препятствует полимеризации микротрубочек и блокирует клетки в G2/M-фазе клеточного цикла. В данной статье показано, что при использовании одинакового метода подготовки образцов клеток можно получить сопоставимые результаты при использовании как цитометров с функцией визуализации клеток, так и проточных цитометров. Также показано, что применение цитометров с функцией визуализации клеток позволяет получить аналогичные результаты при использовании живых и адгезивных клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Определение содержания ДНК в клетках путем инкорпорации ДНК-связывающих красителей является хорошо отработанным методом анализа клеточного цикла. Традиционно анализ содержания ДНК проводился с помощью проточных цитометров. Однако благодаря большей пропускной способности образцов, возможности проведения анализа *in situ* адгезивных клеток и одновременному получению важной морфологической информации все более перспективным становится использование цитометров с функцией визуализации клеток. В данной статье продемонстрированы возможности системы визуализации клеток Cytell™ от GE Healthcare, обеспечивающей все эти преимущества при минимальной пробоподготовке.

[1] Нокодазол – это очень токсичное и опасное вещество, обращаться с которым необходимо в соответствии с паспортом безопасности вещества (MSDS) и локальными инструкциями по технике безопасности в лаборатории.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

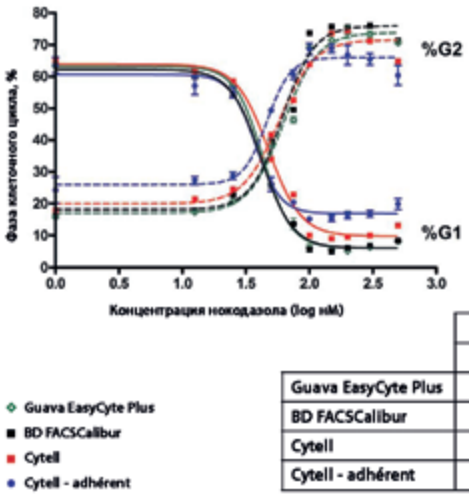
Для подготовки клеток использовались следующие два метода.

<table>
<tr><th colspan="3">Метод 1: Стандартное приготовление испытуемого раствора для проточных цитометров</th><th colspan="2">Метод 2: Приготовление испытуемого раствора для цитометров с функцией визуализации клеток</th></tr>
<tr><td rowspan="2">День 1</td><td colspan="4">1-й этап. Посев клеток HeLa в многолуночный планшет. Инкубирование на протяжении ночи при температуре 37 °C и 5% CO_2.</td></tr>
<tr><td colspan="2">1x10^5 клеток на лунку в 12-луночном планшете Corning Costar™ (Corning Inc.)</td><td colspan="2">8x10^3 клеток на лунку в 96-луночном планшете (Greiner Bio-One)</td></tr>
<tr><td>День 2</td><td colspan="4">2-й этап. Замена среды на бессывороточную и помещение в инкубатор на 24 ч (опционально).</td></tr>
<tr><td rowspan="2">День 3</td><td colspan="4">3-й этап. Замена среды на смесь нокодазола (12,5–500 нМ) с DMEM +10% FBS. Один столбец (контрольный) остается необработанным. Помещение в инкубатор на 16 ч.</td></tr>
<tr><td colspan="2">1 мл нокодазола на лунку (один репликат на концентрацию)</td><td colspan="2">100 мкл нокодазола на лунку (четыре репликата на концентрацию)</td></tr>
<tr><td rowspan="6">День 4</td><td rowspan="6">30 мин
↓
3 ч
↓
35 мин
↓</td><td rowspan="2">4-й этап. Отделение среды от лунок и сбор в центрифужные пробирки. Отделение клеток из лунок с использованием трипсин-ЭДТК и добавление в центрифужные пробирки со средой, приготовленной в течение ночи.</td><td rowspan="2">45 мин
↓</td><td>4-й этап. Добавление 50 мкл на лунку полной среды с последующим добавлением 50 мкл на лунку реагентов Cytell™ Cell Cycle Kit (4× концентрации). Инкубирование при температуре 37 °C, с 5% CO_2 в течение 45 мин.</td></tr>
<tr><td>Анализ: с использованием приложения Cytell™ Cell Cycle BioApp, достаточное поле для сбора не менее 5000 клеток на лунку.</td></tr>
<tr><td>5-й этап. Центрифугирование при 300 г в течение 5 мин и удаление супернатанта. Двойная промывка с PBS.</td><td colspan="2" rowspan="4"></td></tr>
<tr><td>6-й этап. Удаление супернатанта и фиксация клеток 200 мкл с холодным 70%-м этанолом при температуре 4 °C в течение 4 ч.</td></tr>
<tr><td>7-й этап. Центрифугирование при 300 г в течение 5 мин и удаление супернатанта. Двойная промывка с PBS.</td></tr>
<tr><td>8-й этап. Окрашивание клеток путем добавления 200 мкл реагента Guava Cell Cycle Reagent (Merck Millipore). Инкубирование в течение 30 мин при комнатной температуре в защищённом от света месте.</td></tr>
<tr><td></td><td>Анализ: Не менее 5000 клеток на образец или достаточное поле для сбора 5000 клеток на лунку.</td><td colspan="2"></td></tr>
</table>

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

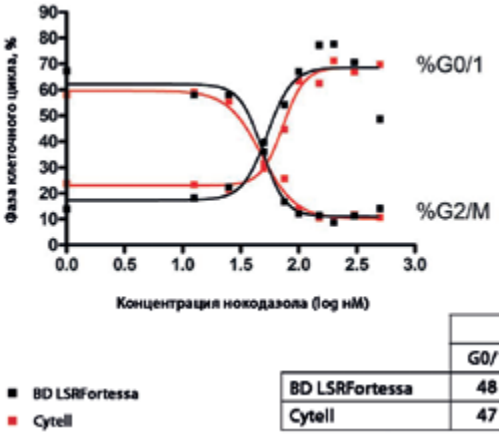
Для сравнения производительности систем при проведении анализа дозозависимого эффекта с фиксированными суспензионными клетками три порции образцов клеток подготавливались по методу 1, а затем анализировались с помощью проточных цитометров и системы Cytell™. Согласно полученным результатам возрастающая доза нокодазола значительно увеличивает количество клеток в фазе G2/M клеточного цикла и в то же время снижает количество клеток в фазе G0/1 (рисунок 1). Значения EC_{50} для фаз G0/1 и G2/M были сопоставимы для различных платформ.

Для сравнения результатов анализа адгезивных и суспензионных клеток клетки снова подготавливались по методу 1, но оставлялись в адгезивном состоянии, исключая этапы 4 и 5, а затем анализировались с использованием системы Cytell™. Результаты анализа дозозависимого эффекта и EC_{50} были сопоставимы с результатами, полученными при анализе суспензионных клеток, и показали аналогичное распределение фаз клеточного цикла (рисунок 1). Использование адгезивных клеток с системой Cytell™ значительно улучшило эффективность эксперимента, устраняя необходимость использования трипсина для отделения клеток, а также множество этапов центрифугирования и про-



	EC_{50}	
	G0/1	G2/M
Guava EasyCyte Plus	43	63
BD FACSCalibur	42	61
Cytell	48	57
Cytell - adhérent	38	47

Рисунок 1. **Кривая дозозависимого эффекта, показывающая влияние нокодазола на процентное содержание клеток в фазах G1 и G2. Зафиксированные этанолом HeLa-клетки анализировались в суспензии с использованием проточного цитометра и системы Cytell™. Одновременно подготовленный образец адгезивных клеток был проанализирован для сравнения с использованием системы Cytell™ (синяя кривая)**



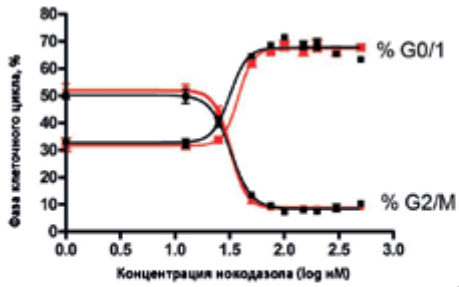
	EC_{50}	
	G0/1	G2/M
BD LSRFortessa	48	54
Cytell	47	73

Рисунок 2. **Кривые дозозависимого эффекта для фазы клеточного цикла, полученные для фиксированных этанолом HeLa-клеток, окрашенных с помощью комплекта Cytell™ Cell Cycle Kit, обработанных увеличивающейся дозой нокодазола и анализируемых в суспензии с использованием проточной и отображающей цитометрии**

мывки. Это также снизило рабочую нагрузку на 4-й день с 4 до 1,5 ч и устранило потерю клеток и фиксацию артефактов, связанную с отделением клеток.

Для сравнения производительности реагентов комплекта Cytell™ Cell Cycle Kit и общепринятого красителя PI (пропидиум йодит) проводился анализ с использованием клеток в суспензионной форме (подготовленных по методу 1), для визуализации клетки окрашивали с помощью комплекта реагентов Cytell™ Cell Cycle Kit вместо PI. Полученные результаты анализировались с помощью проточного цитометра и системы Cytell™ Cell. Были получены однотипные кривые дозозависимого эффекта и значения EC_{50} (рисунок 2), что демонстрирует сопоставимость реагентов Cytell™ Cell Cycle Kit и общепринятого красителя PI в традиционном методе проточной цитометрии.

Главное преимущество комплекта Cytell™ Cell Cycle Kit состоит в том, что нет требований для фиксации и отделения клеток. Если фиксированные клетки необходимо использовать в последующих даунстрим-процессах (очистке), то фиксация может проводиться. Для демонстрации возможности использования комплекта как с живыми, так и с фиксированными адгезивными клетками живые адгезивные клетки были культивированы в двух 96-луночных планшетах, обработаны нокодазолом и окрашены реагентами комплекта Cytell™ Cell Cycle Kit по методу 2. Одновременно были фиксированы и окрашены клетки одного планшета путем разведения комплекта реагентов 4% PFA для обеспечения итоговой концентрации 2% PFA в лунках и анализа обоих планшетов с использованием Cytell™ Cell Cycle BioApp. Результаты показали, что кривая дозозависимого эффекта и значения EC_{50}, полученные для фиксированных клеток были сопоставимы с результатами, полученными при использовании живых клеток (рисунок 3). Ключевым результатом наблюдения для этих испытуемых систем был эффект фиксации этанола, который привел к существенному увеличению значений EC_{50} для популяции фазы G2/M (т.е. снижение чувствительности).



	EC_{50}	
	G0/1	G2/M
Живые	32	38
Фиксированные	32	32

Рисунок 3. **Кривые дозозависимого эффекта для фазы клеточного цикла, полученные для HeLa-клеток, окрашенных комплектом Cytell™ Cell Cycle Kit и обработанных увеличивающейся дозой нокодазола. Живые и фиксированные с 2% PFA в адгезивном состоянии клетки были проанализированы с использованием системы Cytell™**

Система Cytell™, цитометр с функцией визуализации клеток, имеет дополнительное преимущество в виде формирования клеточных изображений высокого разрешения (рисунок 4), а также проведения анализа распределения фаз клеточного цикла в режиме реального времени. Это позволяет пользователю визуализировать клеточные и внутриклеточные эффекты,

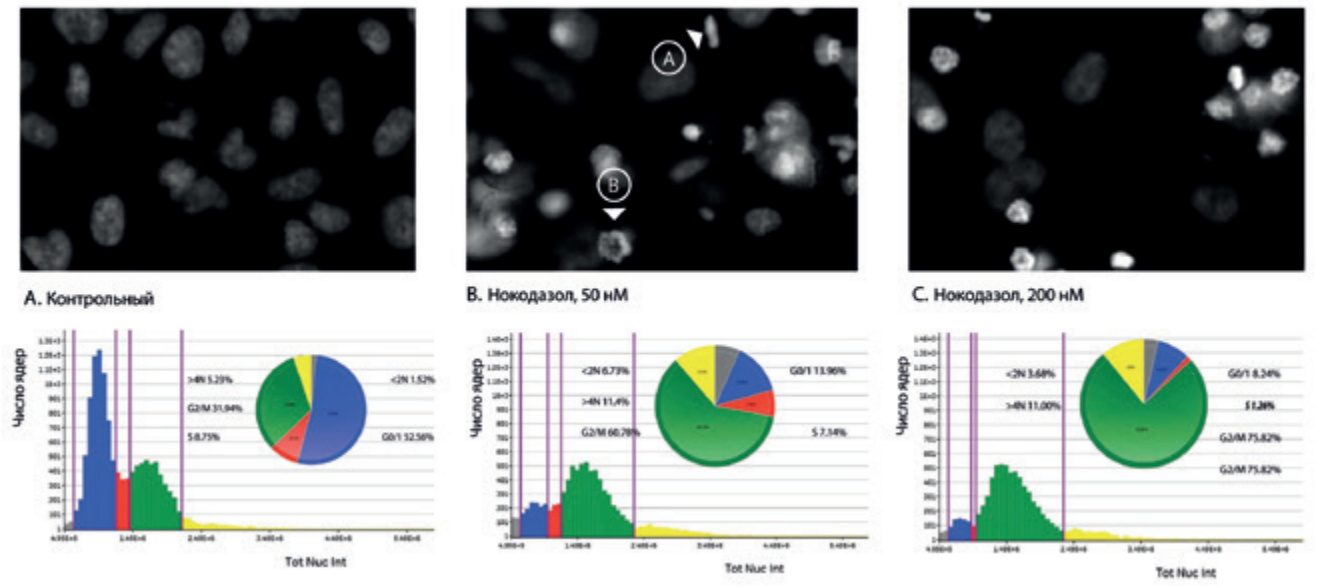


Рисунок 4. Визуализация дозозависимых изменений HeLa-клеток, обработанных в течение 16 ч увеличивающейся дозой нокодазола, деполимеризующего микротрубки цитоплазмы клеток. Система визуализации клеток Cytell™, используемая совместно с комплектом Cytell™ Cell Cycle Kit и настроенными приложениями BioApp, позволяет проводить селекцию гистограмм и визуализацию диаграмм дозозависимых изменений в распределении фаз клеточного цикла

обусловленные фазой клеточного цикла (например, конденсацией ДНК в клеточном ядре G2/M). Кроме того, интерактивные инструменты позволяют проводить идентификацию клеток и отделение дебриса. Результаты анализа клеточного цикла наряду с другими морфологическими данными представлены на графиках с интерактивными окнами для дальнейшей оптимизации фазового распределения (рисунок 4). В данном примере нокодазол вызывает значительное увеличение пропорций ядра, сегрегирующего к популяции G2/M. Возможность просмотра изображений после анализа позволяет проводить дальнейшие наблюдения, например дозозависимого увеличения количества клеток, демонстрирующих четкую метафазную пластинку, визуализированную в прямой (A) и боковой (B) проекциях, как фиксация клеток в метафазе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование системы визуализации клеток Cytell™ совместно с оптимизированным комплектом Cytell™ Cell Cycle Kit и настроенных приложений BioApp обеспечивает гораздо более быструю и простую реализацию протокола по надежному цитометрическому анализу адгезивных клеток. Устранение этапов фиксации и отделения клеток сохраняет морфологию консервированных клеток и их пространственное распределение и в то же время предотвращает потерю консервированных клеток и фиксацию артефактов, которые могут негативно повлиять на результаты. Полученные результаты анализа дозозависимого эффекта и распределения фаз клеточного цикла были сопоставимы с проточной цитометрией при анализе адгезивных и суспензионных форм, живых и фиксированных адгезивных клеток, а реагенты комплекта Cytell™ Cell Cycle Kit сопоставимы с общепринятым красителем PI, используемым в традиционной проточной цитометрии.

Встроенная обработка изображений и возможность интерактивного анализа системы Cytell™ позволяет анализировать и обрабатывать множество образцов за одну операцию, значительно экономя время и трудозатраты. Автоматическое получение результатов, содержащих процентное содержание клеток различных фаз клеточного цикла, данные по интенсивности флуоресценции «клетка – клетка» и морфологические измерения, означает, что не требуется проведение дальнейшего даунстрим-анализа или построение графиков. Интерактивный порог и возможность визуализации клеточных и межклеточных эффектов путем анализа изображений позволяет регулировать пороговые значения, а также мгновенно обновлять гистограммы и наложение изображений, обеспечивая уровень достоверности, не достижимый с использованием проточной цитометрии.

GE Healthcare

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОЧИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ БИОПРОДУКТОВ ПОСРЕДСТВОМ ВНЕДРЕНИЯ РЕШЕНИЙ ПО КОМПЛЕКСНОЙ АВТОМАТИЗАЦИИ

Материал предоставлен компанией GE Healthcare

АННОТАЦИЯ

В биофармацевтической промышленности существует много способов использования данных рабочего процесса в ходе его разработки и на разных стадиях производства. Тем не менее, используемое оборудование нередко объединяет только производственный процесс; материалы просто переходят от одного оборудования к другому. Такое взаимодействие нередко является дискретным – управление оборудованием осуществляется только на инструментальном уровне, что приводит к образованию островков автоматизации. Настоящий документ поясняет, каким образом связность и решения по комплексной автоматизации могут облегчить перенос технологии и масштабирование от разработки процесса до итогового полномасштабного производства. Приемлемые решения по автоматизации также помогут максимально повысить эффективность производственного процесса и эффективность использования средств.

ВВЕДЕНИЕ

В биофармацевтической промышленности существует множество бизнес-моделей. Некоторые компании концентрируются на исследованиях, некоторые – на разработке, некоторые заняты исключительно производством. Также существуют компании, которые в рамках одного бизнеса выполняют все эти функции. В таких сложных операциях, как биофармацевтическое производство, принципиально важным является эффективный бизнес-менеджмент. Способность предоставить пациентам безопасные, эффективные, жизненно важные терапевтические средства зависит от полученных данных и от решений, принимаемых на основе этих данных.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Данные в биофармацевтической промышленности используются множеством способов, как в ходе разработки, так и на разных стадиях производства продуктов (рисунок 1). Решения, основанные на информации, полученной из этих данных, различаются по времени и по фазе: от научных данных, ассоциированных с поиском новых лекарств, до данных процесса, используемых при масштабировании, производственных данных, используемых при достижении соответствия правовым нормам и эффективности промышленного объекта и рыночных данных, основанных на размере целевой популяции. В сильно регулируемых отраслях, таких как биофармацевтическая промышленность, данные создают фундамент, на котом основаны качество и соответствие. Автоматизация является существенным этапом получения данных и управления ими на каждой фазе от цепи поставки до зала заседаний правления. Решения по комплексной автоматизации позволяют захватывать и использовать данные, обеспечивая стабильное производство биотерапевтических продуктов в соответствии с установленными правилами.

В отличие от обычного производства, сконцентрированного на одном продукте, выпускаемом на специализированных предприятиях, в разработке процесса обычно участвует множество препаратов-кандидатов и несколько производственных площадок. На стадии разработки происходит уточнение и улучшение процессов путем экспериментов и выверки в лабораторных условиях. При расширении масштабов процесса до промышленных объемов исследуется влияние этого расширения на экономическую осуществимость, а также на эффективность продукта и его качество. На данной стадии важны многоплановость процесса и экспериментальная гибкость; здесь устанавливаются условия производства и подтверждается, что качественный и количественный уровень выпускаемого продукта сравнимы с таковыми при предыдущем масштабе. При разработке процесса и на стадии его масштабирования собственные системы измерения и управления, разработанные поставщиком приборов, являются общими. Каждый прибор или часть оборудования также оснащается собственным контроллером, действующим на инструментальном уровне. В отличие от разработки «в процессе», когда множество параллельных действий может быть связано между собой бессистемно или вообще не быть связано, эффективные производственные операции требуют тесной координации функциональных групп, сырья, процедур и операций, выполняемых отдельными единицами оборудования и образующих технологическую цепь производства биологических продуктов. Автоматизация играет центральную роль в координации производства и управлении им. Использование оптимальной архитектуры автоматизации позволяет максимизировать эффективность и отдачу от вложения средств, особенно при использовании подхода, основанного на интеграции операций, выполняемых на разных единицах оборудования.

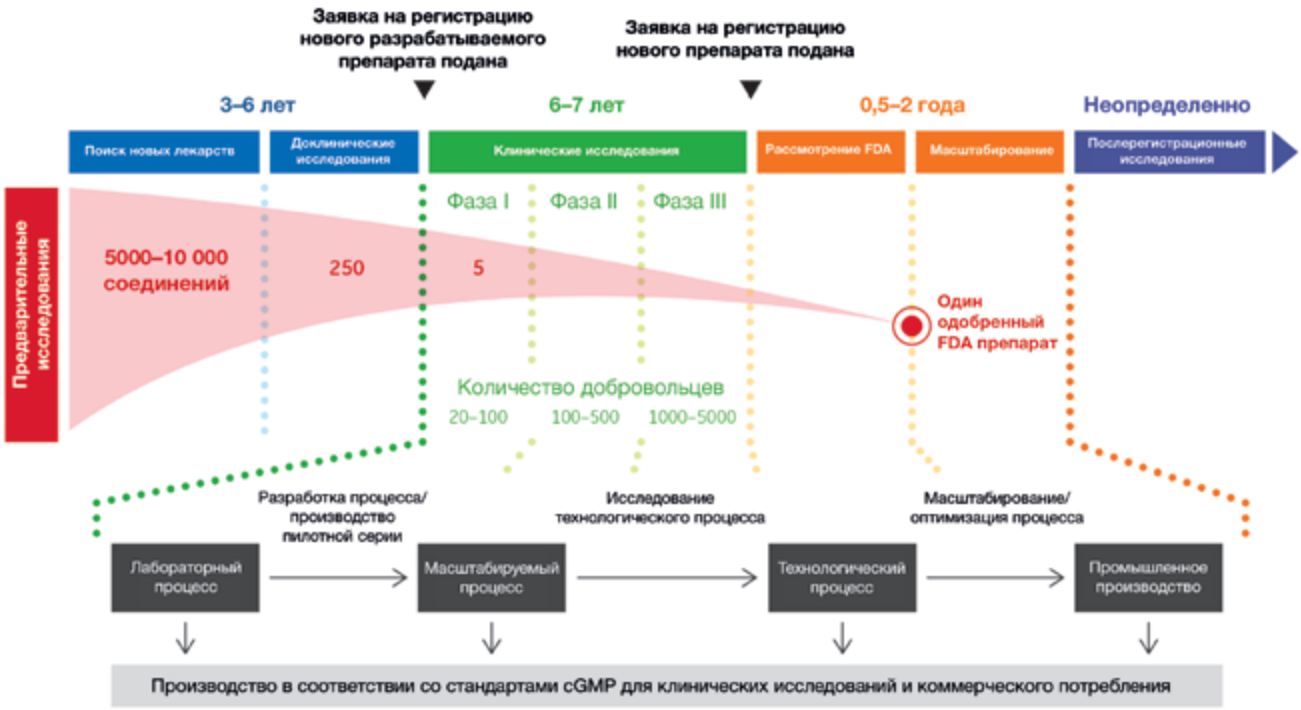


Рисунок 1. **Стадии разработки и производства продуктов**

РАЗРАБОТКА/ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА

При разработке процесса необходимо выбрать из ряда доступных продуктов производственное оборудование и системы, отвечающие требованиям к его использованию. После того как все необходимое выбрано, определяются оптимальные условия выполнения процесса. Необходимо определить, например условия культивирования для максимизации продуктивности вышестоящего этапа производства, или условия очистки для максимизации выработки и чистоты продукта на нижестоящем этапе. Помимо этого, одним из краеугольных камней инициативы QbD (качества через разработку), установленной Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), является ужесточение законодательных требований для лучшего понимания процесса. Данные, генерируемые на этой стадии, подкрепляются соответствующими технологиями анализа процессов и способствуют большему пониманию процесса, что в итоге повышает эффективность процесса разработки.

Для определения или отбора входных параметров, способных повлиять на результат процесса, используется планирование экспериментов (DoE). Используя подход DoE, можно одновременно варьировать различные параметры процесса и изучить влияние каждого из этих параметров или их совокупности. Хотя при использовании DoE с минимальным числом экспериментов может быть получен существенный объем информации о процессе, создается большой объем данных, используемый при принятии обоснованных решений.

Для компаний, пытающихся быстро продвинуться на конкурентном биофармацевтическом рынке, сложным моментом являются разъединенные или несвязные шаги в разработке. Хотя индивидуальный автоматизированный сбор и оценка данных в процессе разработки способствуют сокращению времени выхода на рынок, для ускорения рыночного внедрения предпочтительнее принимать решения по автоматизации, объединяющие раздельные действия по разработке.

ОБОРУДОВАНИЕ И АВТОМАТИЗАЦИЯ

До получения официального разрешения и перехода к стадии производства, многие потенциальные терапевтические лекарственные продукты могут существовать в пакете продукции. Системы разработки процесса должны быть универсальными, чтобы иметь возможность охватывать все производство и быть практичными при работе с разноплановыми пакетами. Стадия разработки допускает большую гибкость при выборе аппаратного и программного обеспечения процесса (например, в процессе, данных, эксплуатации и документировании), чем стадия производства. В отличие от полномасштабного производства, когда место производства и оборудование ориентированы на определенный продукт, при разработке процесса может быть использовано уже имеющееся оборудование, оставшееся от более ранних проектов разработки либо новое. Если часть оборудования, используемая при разработке, была изначально разработана в расчете на широкое применение или может быть с легкостью модифицирована, это позволяет расширить вложения капитала.

Оборудование, используемое при разработке процесса, поступает от множества промышленных поставщиков; каждая единица обладает специфическими чертами и свойствами конструкции, а степень стандартизации устройств различных поставщиков незначительна, либо стандартизация отсутствует. Эти устройства часто имеют собственные подсистемы измерения и управления. Под собственными здесь подразумеваются подсистемы, специально разработанные соответствующим поставщиком. Такие подсистемы делятся на две категории: (1) индивидуальной разработки – сюда относится как электронные компоненты (платы, корпуса и т.д.), так и ПО (часто в формате использования для установки микропрограммного обеспечения); (2) стандартные для отрасли промышленные аппаратные компоненты и готовые программные инструменты разработки. Последнее напрямую относится к программируемым логическим контроллерам (ПЛК) или к программируемым контроллерам автоматизации (ПКА) и программным средствам, поставляемым ПЛК/ПКА – таким, как GE Fanuc™, Rockwell™/Allen-Bradley™ и Siemens™.

В автоматизации такие собственные системы измерения и контроля применяются на инструментальном уровне, уровне оборудования и уровне отдельных единиц оборудования. Системы управления могут различаться даже в зависимости от характера эксплуатации оборудования или его размеров. Кроме того, каждая единица оборудования – биореактор, блок фильтрации или хроматографическая система, имеет собственный контроллер, работающий на инструментальном уровне. Различное оборудование связано между собой только производственным процессом; материал биопроцесса просто переходит от одной его единицы к другой. Такая связь часто является дискретной, операции разработки физически разделены и выполняются по отдельности командами, отвечающими за вышестоящий и нижестоящий этап производства (рисунок 2). Данные, сге-

Рисунок 2. Разработка процесса часто распределена между командами, отвечающими за вышестоящий и нижестоящий этап производства. Кроме того, параллельное ведение разработки вышестоящего и нижестоящего этапа позволяет распределить разработку между различными отделениями, строениями, учреждениями и даже в географическом плане

нерированные оборудованием, можно использовать не только для достижения целей по технологическим показателям, но и для объединения с данными других систем. Обобщенные данные объединяют информацию о разрозненных действиях по разработке, формируя сведения, необходимые для принятия обоснованных решений. Объединение данных для достижения этой цели должен выполнять собственник. Таким образом, система должна, как минимум, быть способна генерировать отчеты и обеспечивать экспорт данных в стандартном формате (например, в табличную сводную ведомость); ее интерфейс должен быть совместим с другими системами посредством стандарта связи на открытой платформе (OPC).

МАСШТАБИРОВАНИЕ И ПЕРЕНОС ПРОЦЕССА

В промышленном масштабе процесс должен давать продукт той же чистоты и с той же выработкой, что и в ходе разработки. Увеличение масштаба биофармацевтического процесса является сложной задачей, затратной по средствам и по времени. На вышестоящем этапе процесса методология масштабирования обычно принимает во внимание сдвиг, окружную скорость, скорость потока жидкости и другие факторы. На нижестоящем этапе необходимо принимать во внимание заполнение колонки, падение гидродинамического давления и эффективность распределения потока жидкости. Сообразная геометрия задействованных производственных резервуаров – таких, как биореакторы для культивирования или хроматографические колонки, облегчает работу на этой стадии. Тем не менее, необходимо обеспечить легкость перехода параметров процесса от одного масштаба к другому. Использование современного измерительного и управляющего ПО системы позволяет экспортировать данные в совместимом с электронными таблицами формате, либо производить обмен с внешними системами по OPC; это значительно облегчает переход от стадии разработки к полномасштабному производству. Установка в сети позволяет легко обмениваться методами, способами и текущими данными между функциональными группами или безопасно хранить их на общем сервере базы данных.

АВТОМАТИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА

Процесс биофармацевтического производства включает приготовление и хранение среды для выращивания культур клеток и буферных растворов, множество стадий культивирования посредством различных биореакторных технологий, стадии очистки белка посредством фильтрации и хроматографирования, концентрацию, буферный обмен и кондиционирование. Все эти операции (выполняемые вне линии, вручную или путем частично автоматизированных процессов) создают наборы данных, способные облегчить выпуск серии препарата, а также анализы процесса и применения. При этом несмежные действия, часто ассоциируемые с разработкой процесса, становятся неприемлемыми. На стадии производства высокоинтегрированная автоматизация становится непременной составляющей для достижения всестороннего управления данными и операционной эффективности. В случае внедрения соответствующей архитектуры автоматизации эффективность процесса и отдачу от вложенных средств можно довести до максимума. В сочетании с другими опорными технологиями, такими как использование компонентов и систем одноразового применения, разработанная должным образом архитектура средств автоматизации может облегчить одновременное изготовление нескольких продуктов. Модель архитектуры S95, предложенная Американским обществом приборостроения (ISA), может быть использована как руководство при обзоре процесса производства, применяемых принципов автоматизации и потока данных (таблица 1).

ISA – отраслевая организация, предметом интереса которой являются контрольно-измерительные приборы и управление, издала многочисленные руководства и стандарты для использования в любой промышленной отрасли, где публикации могут быть ис-

Таблица 1.

Иерархия управления S95

Уровень	Управление	Система	Сеть	В зависимости от биопроцесса
4	Планирование бизнеса и логистика: планирование поставок растительного сырья, операционное управление и т.д.	Планирование ресурсов предприятия (ПРП)	Сеть обмена информацией о производственном процессе	
3	Управление производственными операциями: высылка продукции, подробное планирование производства, отслеживание продукции и т.д.	Системы управления производством (СУП)	Операционная информационная сеть	
2	• Управление партиями • Непрерывное управление • Дискретное управление	• Система управления и сбора данных (SCADA) / программируемые логические контроллеры (ПЛК) • Распределительная система управления (РСУ)	• Сети автоматизированных систем • Сети сообщения между отдельными и задействованными в процессе устройствами	Контроль над выпуском серии, включая периодические и подпитываемые процессы
1	• Температура • Уровень pH • Растворенный кислород (PK) • Оборотов в минуту (об/мин) • Проводимость	• Устройства нижнего уровня • Локальные контроллеры	Приборные шины, сети управления, другие специализированные сети на уровне промышленных устройств	Отдельные производственные единицы: • Биореакторная система • Фильтрационные системы • Хроматографические системы • Смесители
0		• Изготовление серии (периодическое, с непрерывной подпиткой, перфузионное) • Цельная модель производства • Дискретная модель производства		Процесс: • Вакцина • Моноклональные антитела • Рекомбинантный белок

пользованы на практике. Стандарт ISA-95 включает три установленных типа производства: дискретное, серийное и непрерывное. Дискретное производство подразумевает изготовление индивидуальных конечных продуктов – например, образцов оборудования с индивидуальным серийным номером, облегчающим распознавание. Серийное производство относится к продуктам, изготовленным в промежуток времени между началом и завершением определенного процесса. Продукт отслеживается до уровня серии или партии, к которой он принадлежит. Непрерывное производство иллюстрируется процессами, в которых индивидуальные продукты не могут быть распознаны поединично. Добыча нефти и газа – это типичный пример непрерывного производства.

Биофармацевтическая промышленность в настоящее время в основном сосредоточена на том, что по определениям ISA можно считать серийным производством. Серия подразумевает три общих типа биопроцесса: периодическое культивирование, культивирование с подпиткой и перфузионное культивирование. Каждый из них имеет свои собственные характеристические кривые, как показано на рисунке 3. Перфузия являет собой процесс, наиболее близкий к непрерывному производству, но с установленной длительностью от недель до месяцев.

УРОВЕНЬ 0: ПРОЦЕСС

Уровень 0 по ISA-95 применительно к биопроизводству означает, например изготовление вакцины, моноклонального антитела или рекомбинантного белка. В основе биопроизводства на сегодняшний день лежит работа с живыми организмами – клеточной или

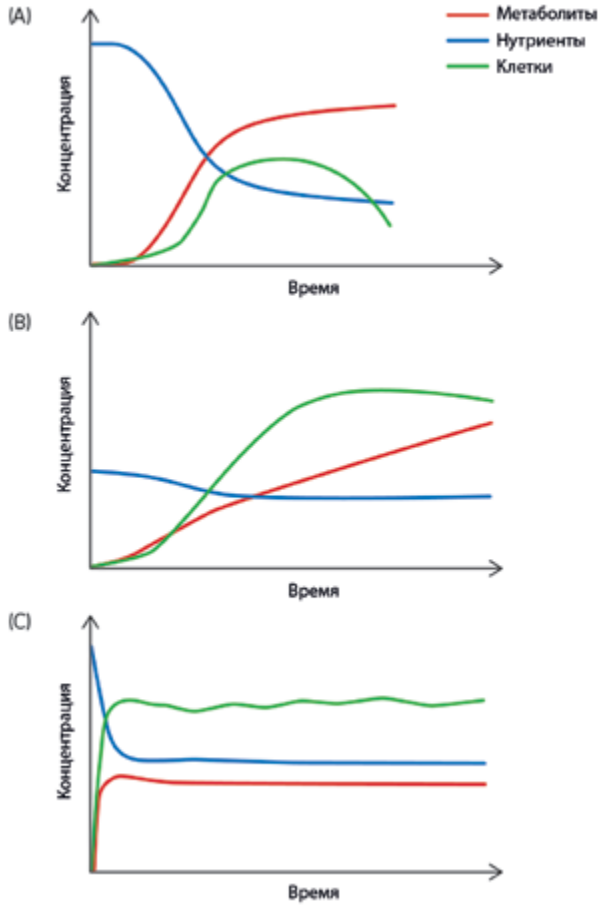


Рисунок 3. Примеры: (A) — периодическое, (B) — с подпиткой, (C) — непрерывное

микробной культурой с установленным периодом выращивания. В этот период осуществляется изготовление серии продукта. Вне зависимости от того, сколько длится период результативного роста, он когда-то завершается, и этот момент является завершающим для серии. В архитектуре автоматизации данный производственный процесс используется как основание для внедрения еще двух уровней (уровень 1 и 2).

УРОВЕНЬ 1: УПРАВЛЕНИЕ НА ИНСТРУМЕНТАЛЬНОМ УРОВНЕ

Уровень 1 по ISA-95 относится к операциям отдельных блоков и устройств нижнего уровня для измерения и управления параметрами процессов — такими как температура, скорость вращения, уровень pH, содержание растворенного кислорода, скорость потоков газа и жидкости, вес и давление. К устройствам измерения относятся датчики и работающие с ними устройства передачи. К категории устройств управления нижнего уровня относятся такие компоненты, как пневматические клапаны, перистальтические насосы и электродвигатели привода мешалок.

УРОВЕНЬ 2: АВТОМАТИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА

Когда автоматизация охватывает весь завод, появляется возможность координировать слежение и управление каждым отдельным прибором или блоком (уровень 1) для повышения эффективности операций. Соединение операций отдельных блоков с привлечением разнообразных программных средств упрощает сообщение внутри процесса, а также передачу и архивацию данных.

Компоненты, обеспечивающие связь между устройствами, также обеспечивают обмен параметрами процессов между программами управления системой и другими заводскими программами управления, такими как системы Rockwell, DeltaV™, Honeywell или Siemens. Существует два основных пути достижения автоматизации процесса, основанных на интеграции операций различных блоков: (1) система SCADA, действующая на уровне завода и сопряженная с ПЛК или (2) с РСУ. Внедрение SCADA/ПЛК или РСУ относится к уровню 2 по ISA-95.

Сценарий SCADA/ПЛК являет собой восходящий подход на инструментальном уровне, отражающий вариабельность цепи поставок оборудования, так как он относится к типу автоматизации оборудования, практикуемому многочисленными поставщиками. Работа каждого блока потенциально представляет собой уникальный островок автоматизации, включая выполнение определенных замеров (температуры, уровня pH и т.д.), привлечение устройств нижнего уровня (клапанов, насосов, электродвигателей) и локальных контроллеров. Как правило, значение уставки, введенное в SCADA направляется на ПЛК, который сравнивает величину, полученную путем замера, со значением уставки и вводит поправки в процесс, добиваясь соответствия с ней. Платформы автоматизации на основе SCADA/ПЛК часто используются для контроля периодического культивирования или культивирования с подпиткой.

РСУ основана на нисходящем подходе с зависимостью от распределенных сетей устройств измерения и управления. Использование РСУ являет собой более современный, высокоинтегрированный подход к автоматизации, затрагивающий весь производственный процесс. В данной среде работа отдельных блоков не требует контроля на инструментальном уровне, как в случае с ПЛК, вследствие чего островки автоматизации становятся неактуальными. Контроль осуществляет РСУ. На уровне оборудования необходимы только специальные измерительные и управляющие устройства нижнего уровня. Как правило, в рамках РСУ работают контроллеры одного поставщика (например, Emerson или Siemens) и стандартные и собственные

протоколы связи (например, Foundation fieldbus™, PROFIBUS™, DeviceNet™). Измеренные показатели процесса передаются на РСУ по инструментальным сетям и сетям управления. Когда значение, полученное путем замера, достигает величины уставки, РСУ направляет команду, например на открытие или закрытие клапана до достижения уровня уставки. Платформы автоматизации на основе SCADA/РСУ обычно используются для управления как периодическим культивированием, так и непрерывным культивированием. Управление в масштабе промышленного предприятия – родная функция РСУ. В то время как платформы на основе SCADA/ПЛК обычно выполняют наборы команд на уровне операций отдельного блока, платформы РСУ выполняют команды, охватывающие весь процесс.

УРОВЕНЬ 3: СИСТЕМА УПРАВЛЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВОМ (СУП)

СУП используется для мониторинга и документирования процессов, от стадии сырья до готового продукта. СУП производит захват данных процесса и его результатов в реальном времени, чтобы использовать их при принятии решений – например, для повышения производительности процесса. СУП используется в межфункциональных группах, например при планировании производства, составлении подробных планов производства, в ведении учета и отслеживании продукции.

СУП действует на уровне 3 по ISA-95, выполняя обмен данными между производственными цехами на уровне 2 и отделами бизнес-планирования и логистики на уровне 4. Например, данные с уровня 2, относящиеся к отслеживанию продукции, накапливаются в СУП и используются для составления отчета о производственных показателях, который направляется в систему уровня 4. Информация интерпретируется на уровне 4 и полученный результат может использоваться в СУП для содействия в оптимизации использования ресурсов, например материалов, оборудования и персонала, при планировании производства.

УРОВЕНЬ 4: ПЛАНИРОВАНИЕ РЕСУРСОВ ПРЕДПРИЯТИЯ (ПРП)

Система ПРП, функционирующая на уровне 4 по ISA-95, позволяет проводить интегрированный общий обзор всех бизнес-процессов, относящихся к производству. Система ПРП осуществляет сбор, хранение и изучение данных из различных отделений. Информация используется, например, при планировании работы с растительным сырьем и для операционного управления. Системы ПРП облегчают информационный обмен между различными отделами и связь с третьими сторонами, например с поставщиками сырья и с логистическими компаниями, отвечающими за распространение конечного продукта.

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССА

Современные концепты производства, такие как «точно в срок» (JIT), LEAN и Six-Sigma, вполне применимы в производстве биопродуктов. Хотя производство биопродуктов сегодня подчинено многим требованиям, как внешним (соответствие законодательству, доступность для аудита, эффективность продукта, его качество), так и внутренним (качество, воспроизводимость, стоимость товаров), целью является максимальное повышение эффективности использования средств. На уровне производства важным аспектом является эффективность использования средств. Получение максимального количества и качества продукта для данного оборудования и помещения является конкурентным преимуществом. Прежние, менее продуктивные способы работы не имеют шансов на выживание, независимо от того, идет ли речь об увеличении количества единиц в серии, увеличении числа серий за установленный период времени, либо о сочетании того и другого.

Интенсификация процесса в разработке и изготовлении биофармацевтических продуктов обычно воспринимается как многообещающий способ сокращения расходов и увеличения выработки. Один из способов интенсификации процесса – это переход от производства серий продуктов к непрерывным процессам. В ходе непрерывного процесса продукт проходит стадии его изготовления непрерывно. Так как при этом может быть использовано оборудование меньших размеров, а необходимость в резервуарах для промежуточного выдерживания сводится к минимуму, соответственно сокращается общая площадь объекта. Поскольку производственные стадии тесно связаны между собой, общее время, затраченное на процесс изготовления, также можно сократить. Таким образом, переход к непрерывному производству может значительно повысить производительность по сравнению с производством серий продуктов.

Работа в замкнутой системе – еще один способ сокращения числа производственных стадий, позволяющий уменьшить потребность в рабочих помещениях и сократить общую длительность процесса. При работе в замкнутой системе предпочтительно применять готовые к использованию и одноразовые продукты, поскольку вследствие того, что продукты готовы к немедленному использованию, отпадает необходимость в отдельной подготовке и их валидации. Применение готовых к использованию продуктов позволяет сократить настройку и запуск процесса. Добавление в процесс оборудования разового использования со-

кращает время перенастройки между циклами изготовления, так как при использовании одноразовых изделий не требуется чистка и валидация чистки между сериями.

Непрерывный процесс поддерживается в устойчивом состоянии. Это означает, что параметры качества, такие как темп подачи сырья, температура, давление и выходной поток, поддерживаются в установленных пределах, что упрощает надзор и контроль. Непрерывные процессы с легкостью встраиваются в рабочие потоки процессов автоматизации. Это способствует поддержке инициативы по введению процессно-аналитической технологии (PAT), предложенной FDA. При использовании автоматизированных рабочих процессов непрерывные процессы также сводят к минимуму риск загрязнения и возможность ошибки со стороны оператора за счет снижения доли ручных работ в промежутках между стадиями производства. Работа на модульных платформах оборудования, в которых аппаратура для выполнения процесса и предпочитаемая поставщиком платформа автоматизации могут быть разъединены, упрощает интеграцию в решения по комплексной автоматизации. Решение по автоматизации, охватывающее всю технологическую цепь биопроцесса с вышестоящим и нижестоящим участками, подчиненное сценарию SCADA-ПЛК или РСУ, может значительно облегчить управление данными и процессами, а также повысить эффективность рабочих процессов при работе в непрерывном режиме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка и производство любого терапевтического или биофармацевтического продукта проводятся различными отделами организации или даже различными организациями. В зависимости от организации (размера; совместно ли расположены все функциональные группы организации, разнесены ли они географически; выполняются ли отдельные этапы процесса внешними подрядчиками), производственные потребности могут сильно различаться – их не объединяет ничего, помимо общего биопроцесса.

«Пустые места» в оборудовании и автоматизации, часто существующие на этапе между разработкой и производством, можно эффективно заполнить, подобрав подходящее оборудование для биопроцесса. Модульная платформа оборудования имеет максимальную степень гибкости. В условиях слаборазвитой или не существующей инфраструктуры автоматизации – в частности на этапе разработки, предпочтительны готовые к эксплуатации модульные системы (включая системы измерения и управления). В случае производства, где может присутствовать инфраструктура автоматизации, такие модульные системы можно будет интегрировать с их подсистемами измерения и управления или без них. Доступность открытых стандартов связи еще в большей степени упрощает интеграцию оборудования как в среде SCADA-ПЛК, так и в РСУ.

Выбор поставщика оборудования, способного поставить выполняющие различные действия блоки, каждый из которых основан на модульной платформе, сочетает вышеописанные преимущества с единоличной ответственностью за интеграцию, работу, документирование и поддержку. Поставщики, предлагающие оборудование разового пользования вместе с расходными материалами, предоставляют даже больше возможностей по выбору при конфигурации разработки эффективного биопроцесса и его практического применения. На стадии разработки вышестоящие и нижестоящие системы можно масштабировать как одно целое, делая возможной оптимизацию физических схем соединений и управления данными. Более того, переход к промышленному масштабу пройдет быстрее и с большей гладкостью. На стадии производства операции, выполняемые на различных блоках, можно рассматривать как составляющие цепи биопроцесса с большей степенью интеграции.

Выбор оборудования привязывает биопроцесс к архитектуре автоматизации. Надлежащий выбор решений по автоматизации, особенно тех, что полностью подчиняют вышестоящий и нижестоящий биопроцесс сценарию SCADA-ПЛК или РСУ, может значительно облегчить управление данными и процессами. Взаимосвязанность данных и решения по комплексной автоматизации позволят выверить такие функции, как материально-техническое обеспечение, финансирование, производство, управление материалами, контроль качества и другие, повысив таким образом эффективность рабочих процессов.

GE Healthcare

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ УДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИЙ СИСТЕМОЙ ВОДОПОДГОТОВКИ THERMO SCIENTIFIC BARNSTEAD SMART2PURE

АВТОР

Верена Ракстахл,
Thermo Fisher Scientific,
Langenselbold, Германия,

Джули Фостер,
доктор наук,
Thermo Fisher Scientific,
Asheville, NC

АННОТАЦИЯ

В настоящей статье представлены результаты удержания бактерий системой водоподготовки Thermo Scientific™ Barnstead™ Smart2Pure™ с помощью метода мембранной фильтрации, описанного в главе 2.6.12.1 Eur.Ph.

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии представляют собой одноклеточные организмы, которые можно обнаружить практически повсюду в действующей лаборатории. Хотя многие из этих бактерий безвредны для здоровья человека, они могут создавать нежелательную изменчивость результатов в эксперименте. По причине их высокой численности и возможности легкой передачи необходимо соблюдать меры предосторожности. Использование не содержащей бактерии воды на таких этапах, как подготовка образца, промывка системы или подготовка буферного раствора, представляет собой простой метод снижения вероятности бактериальной контаминации.

Системы водоподготовки являются надежным источником не содержащей бактерий воды. В среднем такие бактерии, как *Escherichia coli (E. coli)*, которые широко используются в лаборатории, имеют длину около 2 мкм и средний диаметр 0,5 мкм[2]. Чистый мембранный 0,2 мкм финальный фильтр используется для удаления любых частиц или бактерий, чей размер превышает размер пор фильтра. Правильное обслуживание системы очистки воды, включая замену фильтра в соответствии с инструкциями по эксплуатации, способствует обеспечению отсутствия бактерий в воде.

Ультрачистая вода (вода типа 1) из системы очистки Barnstead Smart2Pure была проанализирована на наличие аэробных бактерий. Система Barnstead Smart2Pure 3 выбрана из линейки систем Smart2Pure, которая также включает Smart2Pure модели с ультрафиолетовой (UV) лампой, ультрафильтром (UF), а также их комбинацией. Все эти системы имеют аналогичные требования к исходной воде, общую технологическую схему и финальный 0,2 мкм фильтр. В системы подается водопроводная вода, применяются два этапа очистки для получения лабораторной воды типа 1 с удельным сопротивлением 18,2 МОм. На первом этапе исходная вода очищается с использованием мембраны обратного осмоса (RO) для удаления большей части примесей из воды. На втором этапе очистки применяется деионизационый картидж. Кроме того, в конфигурацию системы могут быть включены опциональная ультрафиолетовая (УФ) лампа и/или ультрафильтр (UF).

УДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИЙ В СИСТЕМЕ SMART2PURE ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЫ В КАЧЕСТВЕ ИСХОДНОЙ

Содержание бактерий в водопроводной воде определялось после дезинфекции слива воды 70% этиловым спиртом и промывки 1 л воды. Затем было забрано и проанализировано на бактериальный рост три образца емкостью 1 л с использованием техники мембранной фильтрации [1]. Из трех образцов объемом 1 л было получено три образца различного объема: 1 л, 10 мл и 1 мл. Эти три образца подверглись фильтрации с помощью нитроцеллюлозной мембраны 0,2 мкм. Затем мембрана была асептическим путем перенесена на R2A-агар

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

и подверглась инкубации при температуре 35 °С в течение 5 дней в компактном микробиологическом инкубаторе Thermo Scientific™ Heratherm™ (модель IMC18). Агаровые пластинки образцов, подвергшихся мембранной фильтрации (1 л и 10 мл), продемонстрировали по прошествии 5 дней инкубации при температуре 35 °С очень большое количество колоний. Только образец объемом 1 мл дал результаты, которые могут быть количественно проанализированы.

После установки и промывки системы Smart2Pure 3 в соответствии с инструкциями по эксплуатации прибор был готов для забора образцов. 0,2 л воды из системы использовались для промывки 0,2 мкм фильтра 0,2 системы Smart2Pure 3, после чего в стерильные колбы были забраны образцы объемом 1 л.

Рисунок 1. Схема системы очистки воды Smart2Pure с встроенным резервуаром емкостью 6 л

Образец емкостью 1 л затем был профильтрован с использованием нитроцеллюлозной мембраны 0,2 микрон и аналитической фильтр-воронки Thermo Scientific™ Nalgene™, как показано на рисунке 2. Затем мембрана была перенесена асептическим путем на R2A-агар и подвергалась инкубации при температуре 35 °С в течение 5 дней в компактном микробиологическом инкубаторе Heratherm (модель IMC18). Система Smart2Pure 3 была продезинфицирована в установленном порядке в соответствии с инструкциями по эксплуатации, картридж предварительной очистки, деионизационный картридж сверхтонкой фильтрации и 0,2 мкм фильтр были заменены новыми для повторного тестирования системы.

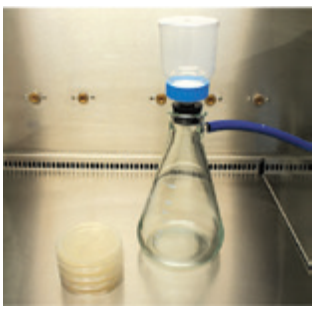


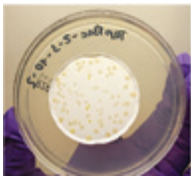
Рисунок 2. Установка для фильтрации образца емкостью 1 л с использованием аналитической фильтр-воронки Thermo Scientific Nalgen с нитроцеллюлозной мембраной 0,2 микрон

РЕЗУЛЬТАТЫ

По прошествии 5 дней было подсчитано количество колоний бактерий, обнаруженных на R2A-агаровых пластинках, также рассчитано количество бактерий на миллион. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Количество бактерий в водопроводной воде (1 л и 10 мл)

	Образец водопроводной воды (10 мл)	Образец воды из системы Smart2Pure (1 л)
1-й анализ		
2-й анализ		

	Водопроводная вода	Вода из системы Smart2Pure
Количество бактерий (КОЕ/мл)	н/п	< 0,01

Примечание: н/п – неприменимо, количество колоний слишком велико для оценки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система Smart2Pure, непосредственно подсоединенная к водопроводу, способна снижать микробиологическую нагрузку водопроводной воды до уровня <0,01 КОЕ/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Европейский директорат по качеству лекарственных средств для здравоохранения (EDQM): Европейская фармакопея 6.8, Микробиологический анализ нестерильных изделий: количественное определение микроорганизмов. 2010.
2. Пособие Thermo Scientific по очистке воды. 2014 г. URL: http://www.thermoscientific.com/purewater (дата обращения 15.09.2016).
3. Инструкции по эксплуатации системы очистки воды Thermo Scientific Barnstead Smart2Pure // Thermo Fisher Scientific. – Germany. 2016.

ПОЧЕМУ КОНТРОЛЬ ИНТЕНСИВНОСТИ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ ВАЖЕН ДЛЯ УЛЬТРАЧИСТОЙ ВОДЫ?

Материал предоставлен компанией Thermo Scientific

АННОТАЦИЯ

Контроль интенсивности УФ-излучения представляет собой инновационную технологию, предназначенную для обеспечения точности показателей концентрации общего органического углерода (Total Organic Carbon, TOC), что обеспечивает высокую надежность ультрачистой воды (воды типа 1).

ВВЕДЕНИЕ

Контроль и отображение содержания TOC в очищенной воде стали особенно важными, поскольку биохимические методы становятся все более чувствительными к низким концентрациям органических веществ. В дополнение к визуализации удельного сопротивления ультрачистой воды требуется определить количество органических примесей в воде. Не содержащая органических примесей вода критически важна для применений, чувствительных к органическим веществам, таких как пробоподготовка для ВЭЖХ и ГХ-МС. Крайне важно, чтобы показатель TOC контролировался во избежание получения отрицательных результатов.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

КОНТРОЛЬ СОДЕРЖАНИЯ ТОС

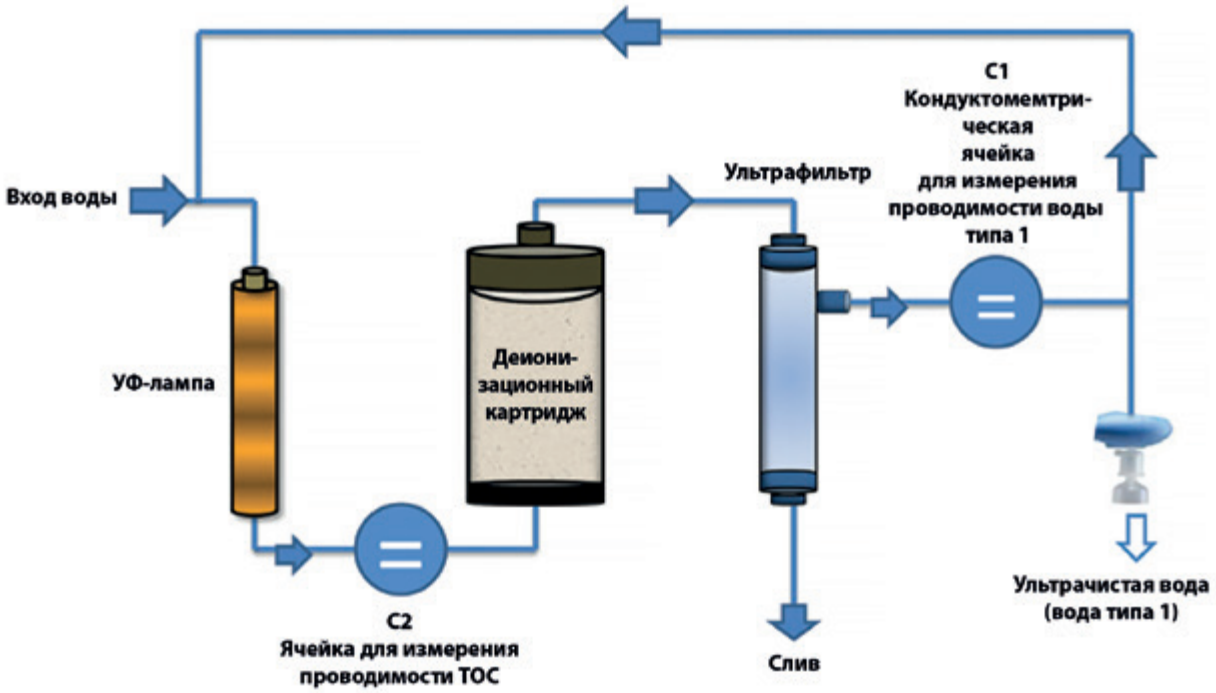
Контроль содержания ТОС представляет собой полезную технологию, которая обеспечивает отображение в режиме реального времени фактической концентрации органических веществ в очищенной воде. Очищенная вода регулярно отбирается для образцов и анализируется на содержание органических примесей с различными интервалами. Для этого измеряется проводимость (С1) очищенной воды, значение хранится в процессоре системы водоподготовки. В процессе рециркуляции вода подвергается воздействию УФ-излучения. Это вызывает окисление всех органических примесей, присутствующих в очищенной воде. В результате окисления органических примесей образуются ионы, которые затем измеряются последующей ячейкой для измерения проводимости (С2). Количество избыточных ионов в воде прямо пропорционально количеству органических примесей, если УФ-лампа функционирует надлежащим образом. Рассчитывается отклонение между показателями ячеек измерения электрической проводимости, после чего отображается значение ТОС.

КОНТРОЛЬ ИНТЕНСИВНОСТИ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ – ОГРАНИЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТОС

Точность измерения содержания ТОС зависит от того, насколько хорошо УФ-лампа облучает воду. Если УФ-лампа светит не в полную силу, общее количество органических веществ в воде не будет полностью окислено, что приведет к получению некорректного показателя. В целях зашиты от этого инженеры Thermo Scientific создали фотоэлектрод, который непосредственно контролирует УФ-лампу и обеспечивает ее исправное функционирование. В случае возникновения проблем система сообщит об ошибке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Если результаты ваших исследований, в которых используется очищенная вода, зависят от концентрации органических примесей, контроль интенсивности УФ-излучения обеспечит точность показателя содержания общего органического углерода (ТОС).



Системы водоподготовки Thermo Scientific Barnstead 1 типа, применяющие данную технологию:

- **Система GenPure™**
- **Система GenPure Pro**
- **Система GenPure xCAD**

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ПИПЕТКА INTEGRA PIPETGIRL ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Материал предоставлен компанией INTEGRA

АННОТАЦИЯ

Швейцарская компания INTEGRA Biosciences с 1965 года проектирует и производит высокотехнологичный лабораторный инструментарий наивысшего качества, используя инновационные технологии. Сверхтехнологичное оборудование направлено на автоматизацию рутинных процессов: отбора проб, стерилизации, приготовления и розлива жидких сред. Среди известных во всем мире приборов под брендом INTEGRA представлены разнообразные пипетки, биореакторы, агрегаты для аспирации, автоматически дозирующие приборы, отвечающие всем международным GxP-стандартам.

ВВЕДЕНИЕ

К своему 50-летию компания INTEGRA Biosciences представила новые надежные инструменты высочайшего качества и точности для исследований рака молочной железы – автоматизированные пипетки PIPETGIRL. Согласно маркетинговой и социальной политике компании €10 с каждой проданной PIPETGIRL будет перечислено на исследования и разработки по предотвращению этой проблемы.

ДОЗИРУЮЩЕЕ УСТРОЙСТВО INTEGRA PIPETGIRL

Новое дозирующее устройство от INTEGRA – это следующая ступень эволюции электронных пипеток PIPETBOY acu 2. PIPETGIRL также имеет мощную перезаряжаемую батарею, обеспечивая независимость отбора проб, подготовки образцов для термостатирования или распределения реагентов от источника питания. Индикаторная лампочка заблаговременно сообщит исследователю о необходимости подзарядки батареи. Выполняя те же функции, что и PIPETBOY acu 2, PIPETGIRL отличается более высокой скоростью пипетирования (если PIPETBOY acu 2 имеет скорость 13,5 мл/с, то PIPETGIRL на 20% быстрее) и непревзойденной точностью. Вес самой пипетки составляет всего 195 г. Как и предшественник, дозатор PIPETGIRL выполнен из качественного пластика, имеет разъём для подключения сетевого адаптера и фильтр защиты от механических включений (0,45 мкм), позволяющий проводить очищение вводимого раствора.

Отличительные особенности PIPETGIRL:

- Turbo-режим увеличивает скорость пипетирования на 20%.
- литийионный аккумулятор обеспечивает более длительное время работы без подзарядки.
- фильтр защиты: стерильный/нестерильный 0,45 мкм или стерильный/нестерильный 0,2 мкм.
- крепление: силикон позволяет удерживать пипетку в стерильном модуле.
- резиновые фильтры: силикон позволяет удерживать фильтр в стерильном модуле.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новая разработка компании INTEGRA – пипетка PIPETGIRL – современное дозирующее устройство для научно-исследовательских структур, специализирующихся на разработке лекарственных препаратов, помогающих бороться с раком молочной железы.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

BINDER
Best conditions for your success

НОВЫЙ ПРОГРАММИРУЕМЫЙ КОНТРОЛЛЕР MB2 ОТ BINDER ДЛЯ КЛИМАТИЧЕСКИХ КАМЕР ПОСТОЯННЫХ УСЛОВИЙ

Материал предоставлен компанией BINDER

ВВЕДЕНИЕ

Компания BINDER GmbH является крупнейшим в мире специализированным предприятием по выпуску камер для моделирования условий окружающей среды, предназначенных для научных и промышленных лабораторий. Своими техническими решениями предприятие вносит существенный вклад в последовательное улучшение охраны здоровья и повышение безопасности людей. Ассортимент продукции подходит как для повседневных процедур, так и для высокоспециализированных работ в сфере исследований и разработок, производства и контроля качества.

С 1 октября 2016 года BINDER GmbH начал выпускать новую модификацию климатических камер KBF 115, 240, 720, 1020 и KMF 115, 240, 720 с новым контроллером.

Новая модификация климатических камер в базовой комплектации обладает рядом особенностей:

- Новый цветной TFT-дисплей размером 5.7" с сенсорным управлением (touch screen);
- Новая интуитивная концепция управления;
- USB-интерфейс для импорта и экспорта данных;
- Возможность удаленного мониторинга данных;
- Блокировка доступа к управлению камерой благодаря организации нескольких уровней доступа с идентификацией через пароли;
- E-mail-оповещение в случае появления ошибок;
- Таймер, функция режима реального времени, недельное программирование.

Климатическая камера постоянных условий BINDER KBF 240 с новым контроллером

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

НОВЫЙ ПРОГРАММИРУЕМЫЙ КОНТРОЛЛЕР MB2

Новый программируемый контроллер MB2 от BINDER GmbH благодаря своим инновационным свойствам обладает большей эффективностью в применении. Наглядный сенсорный дисплей с диагональю 5,7 дюйма, установленный на климатических камерах серий KBF и KMF, отличается интуитивно понятным управлением. С первого взгляда можно узнать все необходимые для ежедневного применения функции. Очень легко переходить от одного пункта меню к другому. С помощью программируемого контроллера регулируются климатические условия во внутреннем пространстве камеры, кроме того, можно запрограммировать циклы изменений температуры и влажности. Ввод нужных значений выполняется непосредственно с поверхности экрана контроллера или опционально с помощью специально разработанного компанией BINDER GmbH программного обеспечения APT-COM с ПК. В программируемом режиме работы можно запрограммировать программу на неделю или выдержку по времени в режиме реального времени. Кроме того, контроллер дает возможность подавать различные визуальные и звуковые сигналы о состоянии и аварийные сигналы. Если сработал сигнал тревоги, в случае необходимости отправляется электронное письмо на указанные адреса электронной почты. Можно ввести до трех адресов электронной почты.

«Максимальная эффективность и максимальная безопасность являются для компании BINDER GmbH приоритетом, – говорит менеджер по продукту Мириам Фауе, – исходя из этого, был разработан новый программируемый контроллер MB2».

Климатическая камера BINDER KBF LQC 720

Защищенные паролем уровни доступа контроллера защищают от несанкционированного доступа. Паролями можно определять уровень авторизованного доступа. Когда это выполнено, доступ к функциям контроллера без регистрации заблокирован. Кроме того, в контроллер интегрирован порт USB. С помощью него осуществляется экспорт и импорт программ и конфигураций устройства. С помощью веб-сервера возможно получить онлайн-доступ к экрану контроллера, например, чтобы просмотреть список событий или сообщения об ошибках. При этом в соответствии с концепцией безопасности нельзя изменять настройки.

Климатическая камера BINDER KBF LQC 240

Климатическая камера BINDER KBF P 240

Фармконтракт®
группа компаний

ТРЕБОВАНИЯ К ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМУ ОБОРУДОВАНИЮ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

АВТОР

И.А. Василенко,

вице-президент по науке
ГК «Фармконтракт», д.х.н.

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени разработаны технологические процессы производства большого числа биофармацевтических продуктов. На рынке технологического оборудования имеется широкий выбор оборудования, которое может быть использовано для решения технологических задач. Поэтому при создании биотехнологического производства перед технологами стоит непростая задача обоснованного подбора технологического оборудования, которое позволило бы осуществить трансфер технологических процессов. Для большого числа биофармацевтических продуктов можно выделить общие стадии: ферментация, сепарация биомассы, дезинтеграция, экстракция, очистка, сушка и модификация выделенного продукта. На каждой из них применяется разнообразное оборудование, принципы работы которого различны. Актуальной задачей для производства является выбор оптимального набора оборудования по заданным критериям.

Необходимо отметить, что за последние 20–30 лет технология производства биофармацевтических субстанций кардинально поменялась. Это связано с достижениями в области материаловедения (внедрение технологии мембранной фильтрации), созданием новых сорбентов для хроматографического разделения смесей, появлением новых видов хроматографии – афинной хроматографии, усовершенствованием методов выделения и очистки продуктов, широким применением автоматизированных систем управления технологическими процессами. Если сравнить технологические процессы двадцатилетней давности и современные, можно сделать вывод, что все изменилось настолько, что технологические приемы, применяемые в то время, в настоящее время не могут быть использованы. К настоящему времени разработан большой перечень технологического оборудования, технологии производства большого числа продукции. Сегодня при создании производства перед технологами стоит задача подбора оборудования, трансфера технологических процессов.

Требования для оборудования, используемого при производстве биофармацевтической продукции, сформулированы в надлежащей производственной практике (GMP). В правилах GMP биофармацевтической продукции посвящен специальный раздел: Приложение № 2 «Производство биологических (в том числе иммунобиологических) фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов». Основное внимание в этом приложении уделено предотвращению различного вида контаминаций, что является принципиально важным для биофармацевтических препаратов. Но остаются обязательными процедуры, которые необходимо выполнять и при производстве других видов лекарственных препаратов – это квалификация оборудования и валидация технологических процессов. То есть с точки зрения правил GMP выбранное технологическое оборудование должно проходить процедуру квалификации, а сам процесс должен быть валидирован. Кроме того, оборудование должно быть достаточно удобно для проведения процедуры очистки. Эти требования относятся ко всем видам технологического оборудования. При выборе того или иного типа оборудования необходимо учитывать возможность проведения процедур квалификации оборудования и валидации процессов.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ФЕРМЕНТАЦИЯ

Ферментация – процесс, в котором происходит преобразование исходного сырья в продукт с использованием деятельности микроорганизмов или изолированных клеток. Практически синонимом слова ферментация можно считать термины «выращивание микробов», «культивирование», «биосинтез». Следует отличать ферментацию от биотрансформации и биокатализа.

Ферментация проводится в аппарате, представляющем собой термостатированный сосуд с мешалкой, позволяющем проводить процесс глубинного выращивания (культивирования) микроорганизмов, культур клеток в заданных условиях. Прототипом ферментера можно считать сосуд с мешалкой для проведения химических процессов синтеза. Это заимствование из области химической технологии никем не оспаривается.

За последние годы происходило внедрение новых форм мешалок, способов термостатирования аппарата, его геометрии. Наибольшие изменения произошли в принципах автоматизации и контроля за параметрами процесса ферментации. Наибольших достижений удалось добиться при внедрении информационных технологий, необходимых при управлении процессом ферментации.

Процесс инокуляции предваряет стадию производственной ферментации и направлен на накопление достаточного количества посевного материала клеток-продуцентов (инокулята). Как правило, объем инокулята составляет не менее 10% от объема промышленного культивирования. Инокуляция проводится в несколько стадий и включает в себя разморозку и восстановление в культивируемых условиях пробирки рабочего банка, рассев первичного инокулята по нескольким пробиркам/колбам, доращивание полученного посевного материала в колбах на шейкере до необходимого уровня концентрации клеток. Полученная суспензия клеток-продуцентов используется для засева производственного ферментера (если ее достаточно) либо для последовательного выращивания в инокуляционных ферментерах до достижения объема инокулята, достаточного для засева производственного ферментера.

Биореактор XDR 50. Производитель: GE Healthcare

Биореактор XDR 1000. Производитель: GE Healthcare

Наибольшие изменения произошли в последние годы в принципах автоматизации и контроля за параметрами процесса ферментации. В состав ферментационного комплекса входят также системы обеспечения паром для стерилизации ферментера, хладоносителя для поддержания необходимой температуры в ходе ферментации, а также специальные порты для различных датчиков, необходимых для поддержания и контроля условий ферментации. Достаточно трудоемким и сложным для валидации является этап очистки ферментера после завершения процесса, особенно если ферментер используется для культивирования различных продуцентов. Это обстоятельство привело к наиболее революционным изменениям на рынке ферментеров – созданию одноразовых ферментеров. Вернее, ферментер (правда, без мешалки) и вся его обвязка остаются, но в него вставляется одноразовый стерильный пластиковый мешок (его емкость доходит до нескольких кубометров), с мешалкой, системой подачи газов и датчиками, в котором собственно и происходит ферментация. После ферментации культуральная жидкость с клетками продуцента передается на следующую стадию, а мешок утилизируется. Это позволяет сократить период между циклами культивирования, избежать сложных и дорогих процессов очистки и стерилизации ферментера, а также сни-

Биореактор XDR 2000. Производитель: GE Healthcare

мает необходимость проведения весьма непростой процедуры валидации очистки ферментера. В ряде случаев для ферментеров небольших размеров производители предлагают одноразовые жесткие пластиковые ферментационные емкости со всеми принадлежностями.

Если биореакторы для ферментации прокариотических (бактериальных) продуцентов и продуцентов на основе дрожжевых клеток принципиально не отличаются между собой, то для культивирования продуцентов на основе клеток млекопитающих (чаще всего CHO) используют несколько различных подходов. Наиболее распространенные – роллерное культивирование, культивирование в биореакторе классической конфигурации с механическим перемешиванием и культивирование в так называемом волновом биореакторе.

Роллерное культивирование применяется, когда продуцент может функционировать, только прикрепившись к какой-то поверхности. Сейчас такой способ культивирования постепенно уходит в прошлое, поскольку новые продуценты могут функционировать в суспензии. При роллерном культивировании клетки засеиваются в одноразовые пластиковые цилиндрические флаконы объемом до 2 литров, при этом количество культуральной среды в таком флаконе – несколько сот миллилитров. Флаконы размещаются в так называемых роллерных шкафах, которые обеспечивают постоянное вращение флаконов. При этом внутренняя поверхность роллерного флакона смачивается культуральной жидкостью, что позволяет клеткам-продуцентам равномерно расти по всей внутренней поверхности роллерного флакона. Стандартный размер роллерного шкафа – 98 флаконов, шкаф позволяет поддерживать необходимую температуру и, что очень важно, необходимый процент CO_2 (во флаконы CO_2 попадает через встроенный в крышку флакона фильтр). Периодически культуральная жидкость, содержащая целевой продукт, из флаконов сливается, вместо нее заливается свежая питательная среда, и культивирование продолжается.

Культивирование в биореакторе мало отличается от процесса в микробиологическом ферментере. Основные различия – в конфигурации колбы и мешалки биореактора, системе газоснабжения, системе подпитки при культивировании и параметрах контроля процесса.

Установка волнового культивирования представляет из себя качающуюся платформу, на которую крепится стерильный одноразовый пластиковый мешок с культуральной жидкостью, подачей газов и подпиток, необходимыми датчиками, но без мешалки. Перемешивание обеспечивает специальный режим покачивания платформы, что позволяет создавать в мешке волну (эта волна и дала название этому типу биореакторов), которая и обеспечивает необходимое перемешивание клеток в среде.

Существует целый ряд других видов биореакторов (реактор на тангециальных мембранах, реактор воздушного лифта и проч.), но широкого применения в промышленности они не нашли.

Отдельно необходимо упомянуть так называемые системы перфузии, применяемые главным образом при культивировании эукариотических продуцентов. Эти установки позволяют в процессе ферментации отводить из ферментера часть культуральной жидкости без клеток, возмещая ее свежей питательной средой. Чаще всего такие системы используются в культивировании продуцентов на основе клеток млекопитающих, особенно если целевой

Нутч-фильтр. Производитель: BuchiGlasUster

Вертикальная фильтрующая центрифуга. Производитель: HEINKEL

продукт оказывает угнетающее действие на продуцент. В последнее время системы перфузии применяются все шире, так как позволяют значительно снизить капитальные затраты на создание ферментационных мощностей. Это объясняется тем, что перфузия позволяет многократно (в 20–50 раз) увеличить сбор культуральной жидкости с единицы объема биореактора по сравнению с однократным процессом и значительно продлить период культивирования за счет создания более стандартных условий для жизнедеятельности продуцента. Так, например, если для однократного получения 100 л культуральной жидкости нужен биореактор с полным объемом колбы в 120–150 л (100 л рабочий объем), то те же 100 л можно получить, используя 3-литровый биореактор с системой перфузии.

Следует отметить, что зачастую требования к параметрам биореактора определяются оптимальными условиями для роста клеток продуцентов, поэтому выбор реактора надо всегда проводить с прицелом на параметры конкретного продуцента. Отдельной задачей является масштабирование процесса культивирования, поскольку, как правило, изменение условий тепломассообмена при переходе на биореактор большего объема существенно сказывается на эффективности культивирования.

СЕПАРАЦИЯ

Сепарация является обязательным этапом после культивирования как в случае внутриклеточного накопления целевого продукта (чаще всего – накопления белка в виде «телец включения» внутри клеток *Escherichia coli*), так и при выделении продукта в культуральную жидкость (например, при использовании эукариотических продуцентов, таких как клетки CHO). Только в первом случае собирается и запускается в дальнейшую переработку сконцентрированная биомасса клеток, а культуральная жидкость отбрасывается, а во втором случае, наоборот, целью является культуральная жидкость, а биомасса клеток отбрасывается.

После проведения процесса ферментации стоит задача отделения биомассы от культуральной среды. Центрифугирование не всегда применимо для этих целей, несмотря на то, что при центрифугировании происходит наименьшая потеря биомассы. Чаще используются сепараторы, которые нашли широкое применение в пищевой (молочной) промышленности. Есть серьезный недостаток применения сепараторов – потери биомассы. Довольно сложны процедуры очистки аппаратуры при переходе от одного процесса к другому. Прорывных достижений в процессе сепарации не просматривается.

ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ

Процедура дезинтеграции необходима в случае выделения продуктов биосинтеза, которые локализованы внутри клеток. Применяют механические дезинтеграторы, но они не всегда дают положительный результат, так как механические воздействия не всегда приводят к нарушению клеточной стенки, которая препятствует выходу веществ из внутреннего объема клеток. Для разрушения клеточных стенок применяют обработку биомассы лизирующими агентами. Аппаратурно использование лизирующих агентов реализуется в виде реактора, в котором и происходит данный процесс.

ЭКСТРАКЦИЯ

Технологическая стадия экстракции применима при выделении гидрофобных, водонерастворимых молекул. Большая часть биофармацевтической продукции – это водорастворимые вещества, поэтому стадия экстракции достаточно редко используется при производстве биофармацевтической продукции.

Хроматографическая система AKTA Ready. Производитель: GE Healthcare

Картириджный фильтр. Производитель: Merck

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА

Выделение и очистка биотехнологических продуктов – самостоятельный раздел биотехнологии, претерпевший серьезные изменения в последние годы. Этим проблемам посвящено большое число публикаций. Необходимо отметить, что выделение и очистка по сложности процессов, затратам энергии, материалов значительно превосходит стадию получения биомассы. В данном разделе мы остановимся только на оценке достижений и перспективах развития.

На начальном периоде развития биотехнологии применялись процедуры осаждения и кристаллизации, которые сопровождались большими потерями целевого продукта. В настоящее время наибольшую популярность при производстве биофармацевтической продукции приобрели процессы фильтрации и хроматографии. Успехи применения хроматографии и фильтрации связаны с разработками новых материалов для процессов фильтрации и хроматографии. Бурный рост примеров применения хроматографических методов как технологического приема начался в 80-е годы прошлого века и продолжается до сих пор. При выделении белков используют следующие виды хроматографии: афинную, ионообменную, хроматографию смешанного типа, гидрофобную и эксклюзионную хроматографию. Применимость того или иного вида хроматографии, конечно, определяется в первую очередь поставленной задачей, свойствами выделяемого вещества, а также доступностью сорбентов, хроматографических колонок. При использовании хроматографии применяют препаративные хроматографы.

Процесс фильтрации позволяет выделить фракции с определенным набором молекулярных масс, это и является основной характеристикой материалов, используемых при производстве фильтров. Фильтрация используется также в процессе водоподготовки, стерилизации готовой продукции. При переходе от одной серии к другой, при смене продукта возникают проблемы очистки технологических аппаратов, связанные с наличием в них так называемых мертвых зон. Несмотря на эти трудности, пока альтернативы применению хроматографии и ультрафильтрации в производстве биофармацевтической продукции нет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биофармацевтическая отрасль динамично развивается в последние годы. Несмотря на кризисные явления в экономике, растет объем производства биофармацевтической продукции на 5–10% в год. Можно выделить следующие направления развития биофармацевтической промышленности, которые, вероятнее всего, получат наибольшее развитие в ближайшем будущем.

– Создание новых перспективных штаммов–продуцентов. Это непрерывный процесс, который расширяет возможности производителей биофармацевтической продукции.

– Усовершенствование методов очистки и выделения конечных продуктов. Данное направление связано с развитием хроматографических методов анализа и очистки конечных продуктов.

– Разработка биологических методов модификации фармацевтически активных молекул.

– Разработка перспективных систем доставки лекарственных препаратов.

– Усовершенствование нормативно-правовой базы обращения биофармацевтической продукции. Это направление связано с изменениями правил производства (соответствующих разделов правил GMP).

– Подготовка кадров. В настоящее время ощущается дефицит кадров технологов и разработчиков соответствующего оборудования.

ЛИТЕРАТУРА

1. М.Е. Бекер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис. Биотехнология. – М.: ВО Агроиздат, 1990 . 480 с.
2. Комментарий к руководству Европейского союза по надлежащей практике производства лекарственных средств для человека и ветеринарии / Под редакцией С.Н. Быковского, И.А. Василенко, С.В. Максимова. – М.: изд-во «Перо», 2014. 498 с.
3. Н.С. Егоров. Основы учения об антибиотиках. – М.: изд-во Московского университета, 1994. 266 с.
4. D.A. Williams, T.L. Lemke. Foie's principles of medicinal chemistry. – N.Y.: Lippiincott Williams & Wilkins, 2005. 324 p.
5. Д. Энде. Производство лекарственных средств. Химическая технология от R&D до производства. – СПб.: Издательство «Профессия», 2015. 326 с.

KINEMATICA AG
Dispersing and Mixing Technology

ПРИМЕНЕНИЕ ДИСПЕРГАТОРА MEGATRON® В ТЕХНОЛОГИИ ЭМУЛЬСИЙ И СУСПЕНЗИЙ[1]

АВТОР

Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая, А.Н. Ляпунов,

ГНУ «НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины, г. Харьков

ВВЕДЕНИЕ

Размер частиц дисперсной фазы в эмульсиях и суспензиях, а также их распределение по размерам являются важными факторами для фармацевтического производства, от которых зависят качество, биодоступность, эффективность и безопасность лекарственных препаратов, представляющих собой дисперсные лекарственные формы с жидкой дисперсионной средой. Размер частиц эмульсий и суспензий также важен для качества косметических средств. На этапе фармацевтической разработки лекарственных препаратов необходимо оценить влияние размера частиц дисперсной фазы на функциональные свойства лекарственного препарата, установить связь с высвобождением и биодоступностью действующих веществ и/или эффективностью и безопасностью препарата, а также другими его потребительскими свойствами [1]. При необходимости следует стандартизовать размер частиц или их распределение по размерам. В руководстве CPMP / ICH / 367 / 96 corr. (Q6A) «Note for Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances» (схема решений № 3) отмечено, что критерии приемлемости относительно размера частиц (распределения частиц по размерам) для действующих веществ устанавливают, если размер частиц является критическим [2]:

- для растворения, растворимости или биодоступности;
- для технологичности лекарственного препарата;
- для стабильности лекарственного препарата;
- для однородности содержания действующего вещества в лекарственном препарате;
- для сохранения внешнего вида препарата.

Чтобы обеспечить соответствие лекарственного препарата или косметического средства нормам спецификации по показателю «размер частиц», нужно выбрать соответствующее технологическое оборудование и разработать рациональную технологию производства.

Существуют различные технологии диспергирования частиц. Классической является технология измельчения частиц дисперсной фазы эмульсий и суспензий с помощью диспергаторов типа «статор – ротор». Фирма Kinematica AG (Швейцария) под торговым названием Megatron® производит современные диспергаторы такого типа как для разработки технологических процессов в лабораторных условиях, так и для серийного промышленного производства. Это высокоскоростное оборудование, которое предназначено для эффективного диспергирования жидких и твердых частиц в жидкой среде в замкнутом цикле, для чего используют разные конструкции статора и регулируемую частоту вращения ротора до 25000 об/мин.

Впервые опубликовано в журнале «Фармацевтическая отрасль» №5 (58) октябрь 2016 г., С. 66–73.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Цель работы – исследование эффективности диспергирования дисперсной фазы модельных эмульсий и суспензий с помощью лабораторного диспергатора типа «ротор – статор» Megatron® MT 1-50 SHS F/2 (рисунок 1).

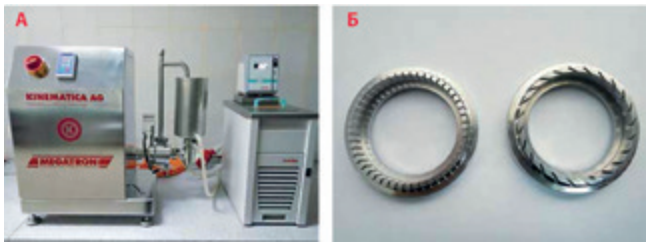


Рисунок 1. Диспергатор типа «ротор – статор» Megatron® MT 1-50 SHS F/2 производства компании Kinematica AG (Швейцария) в комплекте с термостатом Julabo F-25, который выпускает компания Julabo Labortechnik GmbH (Германия) (А), и сменные статоры к диспергатору (Б)

Таблица 1.

Составы эмульсий, использованных в эксперименте

Компонент	Содержание компонентов, % масс	
	Эмульсия № 1	Эмульсия № 2
Бензилбензоат	20,0	–
Вазелиновое масло	–	10,0
Вазелин белый	–	10,0
Цетостеариловый спирт типа А (Kolliphor® CSA, BASF)	1,7	–
Макрогола 20 цетостеариловый эфир (Eumulgin B 2, BASF)	–	2,7
Цетостеариловый спирт (Lanette O, BASF)	–	1,8
Пропиленгликоль	5,0	9,5
Вода очищенная	до 100,0	до 100,0

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объектов исследований использовали эмульсии типа м/в и суспензии. Составы эмульсий представлены в таблице 1.

Эмульсия № 1 представляла собой 20% эмульсию бензилбензоата, который является трудноэмульгируемой жидкостью. В эмульсии № 2 в качестве дисперсной фазы содержалась смесь вазелина белого и вазелинового масла. Состав эмульгаторов для каждой эмульсии был подобран таким образом, чтобы она сохраняла жидкую консистенцию при комнатной температуре, а эмульгаторы не оказывали существенного влияния на размер частиц масляной фазы, то есть был исключен эффект самоэмульгирования.

Для изготовления эмульсий компоненты загружали в вакуумный реактор-гомогенизатор РП-5Д [3], нагревали до температуры 70 °С, перемешивали до плавления эмульгаторов, эмульгировали в течение 10 мин при частоте вращения турбинной мешалки 3000 об/мин и охлаждали до комнатной температуры при перемешивании скребковой и лопастной мешалками. Изготовленную эмульсию помещали в бункер диспергатора Megatron® MT 1 50 SHS F / 2 (рисунок 1) и обрабатывали при определенной частоте вращения ротора от 5000 до 25000 об/мин в течение 1 мин.

Для изготовления эмульсий и суспензий использовали лекарственные вещества [бензилбензоат, ацикловир, нефопама гидрохлорид (далее – нефопам) и мелоксикам] [4, 5] и вспомогательные вещества, указанные в таблице 1 [5, 6]. Суспензии изготавливали с помощью двух методов.

С использованием метода диспергирования осуществляли механическое измельчение лекарственного вещества в подходящей жидкой среде с помощью диспергатора Megatron® MT 1-50 SHS F/2. Измельчение проводили в течение 1 мин при частоте вращения ротора от 5000 до 25000 об/мин, не допуская нагрева суспензии до температуры выше 40 °С во избежание растворения лекарственного вещества и его перекристаллизации при охлаждении с образованием крупных кристаллов. Суспензию охлаждали путем подачи в рубашку емкости воды с температурой 1±0,2 °С при помощи термостата Julabo F-25 (компания Julabo Labortechnik GmbH, Германия). Средой для диспергирования частиц ацикловира служил пропиленгликоль (ПГ), нефопама – полиэтиленоксид-400 (ПЭО-400), а мелоксикама – этанол (96%). Выбор растворителей осуществляли с учетом растворимости в них действующих веществ в зависимости от температуры и способности растворителей к смачиванию порошков [7, 8].

По второму методу лекарственное вещество полностью растворяли при нагревании в подходящем растворителе с получением насыщенного раствора, который затем помещали в бункер диспергатора Megatron® MT 1-50 SHS F/2 и при перемешивании охлаждали с помощью термостата Julabo F-25. При появлении признаков кристаллизации лекарственного вещества из насыщенного раствора проводили диспергирование образующихся кристаллов при частоте вращения ротора диспергатора 5000 об/мин и охлаждении суспензии до комнатной температуры. В этой технологии сочетается конденсационный метод (изогидрическая кристаллизация) и метод диспергирования.

Размер частиц и их распределение по размерам определяли с помощью метода лазерной дифракции на анализаторе размера частиц SALD-2201 производства компании Shimadzu (Япония) и метода оптической микроскопии с использованием микроскопа с окуляр-микрометром MBL-2100 (компания Krüss, Германия) [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эмульсия № 1 после перемешивания лопастной и скребковой мешалками имеет средний размер частиц около 98 мкм и широкое распределение частиц по размерам (рисунок 2, таблица 2).

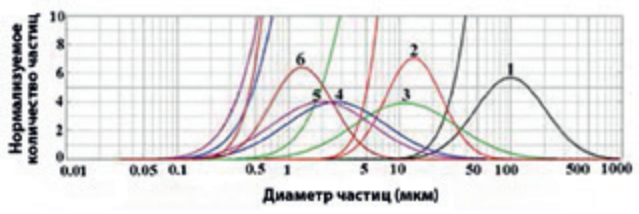


Рисунок 2. Распределение частиц дисперсной фазы по размерам в эмульсиях бензилбензоата 20% (в эмульсиях № 1) при разных режимах их обработки:

1 – исходно (без диспергирования) после перемешивания скребковой и лопастной мешалками с частотой вращения 60 об/мин; 2 – диспергирование турбинной мешалкой в реакторе (3000 об/мин); 3 – диспергирование с помощью Megatron® (5000 об/мин); 4 – диспергирование с помощью Megatron® (10000 об/мин); 5 – диспергирование с помощью Megatron® (15000 об/мин); 6 – диспергирование с помощью Megatron® (25000 об/мин)

Таблица 2.

Некоторые параметры, характеризующие распределение частиц по размерам в эмульсиях № 1 при разных режимах их обработки

Режим обработки	Наибольший диаметр частиц во фракции, мкм			Средний объемный диаметр, мкм
	Dv(10)	Dv(50)	Dv(90)	
№ 1	38,746	98,381	249,167	98,403
№ 2	6,291	13,305	28,501	13,298
№ 3	2,844	11,053	42,914	11,052
№ 4	0,701	2,655	9,974	2,654
№ 5	0,532	1,995	7,483	1,995
№ 6	0,567	1,314	3,025	1,313

Примечание. Dv(10) – наибольший диаметр частиц во фракции с наименьшим диаметром частиц, составляющей 10% от общего числа частиц; Dv(50) – наибольший диаметр частиц во фракции, составляющей 50% от общего числа частиц; Dv(90) – наибольший диаметр частиц во фракции, составляющей 90% от общего числа частиц.

Эмульгирование бензилбензоата в реакторе-гомогенизаторе турбинной мешалкой при частоте вращения ротора 3000 об/мин приводит к уменьшению среднего объемного диаметра частиц в 7,4 раза (до 13,298 мкм). При этом уменьшается диапазон распределения частиц по размерам: в частности, наибольший диаметр частиц во фракции, составляющей 90% от общего числа частиц, уменьшается в 8,7 раза (с 249,167 до 28,501 мкм) (таблица 2).

Обработка эмульсии бензилбензоата 20% с помощью диспергатора Megatron® приводит к существенному уменьшению размера частиц и сужению диапазона их распределения по размерам начиная с частоты вращения ротора 10000 об/мин (таблица 2). После обработки эмульсии бензилбензоата 20% при частоте вращения ротора 25000 об/мин средний объемный диаметр частиц уменьшается до 1,313 мкм, то есть почти в 75 раз по сравнению с исходным диаметром и в 10,1 раза по сравнению с диаметром частиц дисперсной фазы эмульсии, изготовленной в реакторе-гомогенизаторе. При этом 90% от общего числа частиц имеют наибольший диаметр 3,025 мкм, что соответственно в 82,4 раза и в 9,4 раза меньше (таблица 2). Уменьшение размера частиц наглядно продемонстрировано на рисунке 3.

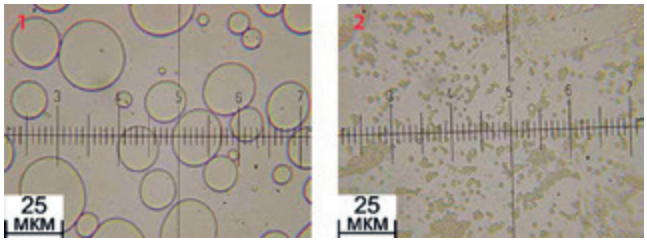


Рисунок 3. Микрофотографии эмульсии бензилбензоата 20%, изготовленной в реакторе-гомогенизаторе при частоте вращения турбинной мешалки 3000 об/мин (1) и обработанной после этого с помощью диспергатора Megatron® при частоте вращения ротора 25000 об/мин (2)

Обработка в диспергаторе Megatron® эмульсии № 2 была еще более эффективной (рисунок 4, таблица 3). Диапазон распределения частиц по размерам сужался, а размер частиц уменьшался по мере повышения частоты вращения ротора. При частоте 15000–25000 об/мин образуются ультрамикрогетерогенные системы, имеющие белый цвет с голубым оттенком и опалесценцией. После обработки эмульсии № 2 при частоте вращения ротора 25000 об/мин средний объемный диаметр частиц уменьшается до 0,934 мкм, то есть почти в 10,9 раза по сравнению с диаметром частиц дисперсной фазы эмульсии № 2, изготовленной в реакторе-гомогенизаторе. При этом 90% от общего числа частиц имеют наибольший диаметр – 2,187 мкм, что в 13,1 раза меньше наибольшего диаметра такой же фракции частиц эмульсии № 2, изготовленной в реакторе-гомогенизаторе (таблица 3).

Диспергатор Megatron® позволяет эффективно диспергировать масляную фазу эмульсий типа м/в. Существенное уменьшение размера частиц и сужение диапазона распределения частиц по размерам представляется важным для однородности эмуль-

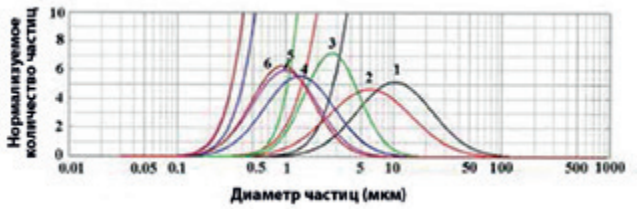


Рисунок 4. Распределение частиц дисперсной фазы по размерам в эмульсионных основах (эмульсиях № 2) при разных режимах их обработки:

1 – диспергирование турбинной мешалкой в реакторе (3000 об/мин); 2 – диспергирование с помощью Megatron® (5000 об/мин); 3 – диспергирование с помощью Megatron® (10000 об/мин); 4 – диспергирование с помощью Megatron® (15000 об/мин); 5 – диспергирование с помощью Megatron® (20000 об/мин); 6 – диспергирование с помощью Megatron® (25000 об/мин)

сий и стандартизации размера частиц (при условии адекватной стабилизации эмульсий как дисперсных систем).

Таблица 3.

Некоторые параметры, характеризующие распределение частиц по размерам в эмульсионных основах, при разных режимах их обработки

Режим обработки	Наибольший диаметр частиц во фракции, мкм			Средний объемный диаметр, мкм
	Dv(10)	Dv(50)	Dv(90)	
№ 1	3,629	10,192	28,620	10,190
№ 2	1,930	6,013	18,795	6,015
№ 3	1,276	2,671	5,652	2,670
№ 4	0,518	1,341	3,488	1,340
№ 5	0,406	0,987	2,411	0,987
№ 6	0,403	0,934	2,187	0,934

Примечание. Пояснения относительно Dv(10), Dv(50) и Dv(90) см. в примечании к таблице 2.

Было исследовано влияние обработки суспензий на диспергаторе Megatron® MT 1 50 SHS F/2 на размер частиц их дисперсной фазы.

Как следует из данных таблицы 4, с повышением частоты вращения ротора возрастает эффективность диспергирования мелоксикама в среде этанола (96%); размер частиц мелоксикама и диапазон их распределения по размерам уменьшаются. Исходно субстанция мелоксикама характеризуется достаточно широким диапазоном распределения частиц по размерам (рисунок 4), но имеет небольшой средний объемный размер частиц – 13,157 мкм (таблица 4).

Обработка суспензии в течение 1 мин при частоте 25000 об/мин позволяет уменьшить средний объемный размер частиц в 1,52 раза, а наибольший размер 90% частиц – в 1,82 раза (таблица 4). Обработка суспензии мелоксикама на диспергаторе позволяет уменьшить размер достаточно мелких частиц и сузить диапазон их распределения по размерам (рисунок 5, таблица 2), что важно для преодоления седиментационной и термодинамической неустойчивости суспензий при хранении [9].

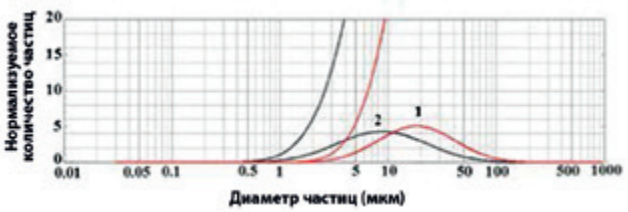


Рисунок 5. Распределение частиц дисперсной фазы по размерам в суспензиях мелоксикама в этаноле (96%) исходно без диспергирования (1) и после диспергирования в течение 1 мин с помощью диспергатора Megatron® при частоте вращения ротора 25000 об/мин

Таблица 4.

Некоторые параметры, характеризующие распределение частиц по размерам в суспензиях мелоксикама, при разных режимах их обработки

Режим обработки	Наибольший диаметр частиц во фракции, мкм			Средний объемный диаметр, мкм
	Dv(10)	Dv(50)	Dv(90)	
Исходно	3,238	13,159	53,635	13,157
5000 об/мин	2,703	11,361	47,688	11,361
15000 об/мин	2,620	10,823	44,829	10,823
25000 об/мин	2,554	8,666	29,551	8,666

Примечание. Пояснения относительно Dv(10), Dv(50) и Dv(90) см. в примечании к таблице 2.

На рисунке 6 и в таблице 5 представлены результаты диспергирования частиц ацикловира в среде ПГ.

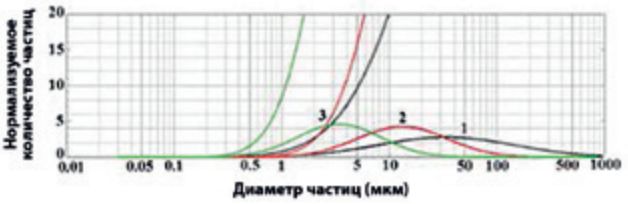


Рисунок 6. Распределение частиц дисперсной фазы по размерам в суспензиях ацикловира в ПГ исходно без диспергирования (1), после диспергирования в течение 1 мин с помощью Megatron® при частоте вращения ротора 25000 об/мин (2) и при сочетании изогидрической кристаллизации с диспергированием при частоте вращения ротора 5000 об/мин (3)

Как следует из рисунка 6 и таблицы 5, обработка суспензии ацикловира на диспергаторе Megatron® в течение 1 мин при частоте вращения ротора 25000 об/мин приводит к уменьшению среднего объемного размера частиц в 2,6 раза, а наибольшего размера частиц в 90%-й фракции – в 4,8 раза.

Таблица 5.

Некоторые параметры, характеризующие распределение частиц по размерам в суспензиях ацикловира в ПГ исходно без диспергирования (1), после диспергирования в течение 1 мин с помощью Megatron® при частоте вращения ротора 25000 об/мин (2) и при сочетании изогидрической кристаллизации с диспергированием при частоте вращения ротора 5000 об/мин (3)

Режим обработки	Наибольший диаметр частиц во фракции, мкм			Средний объемный диаметр, мкм
	Dv(10)	Dv(50)	Dv(90)	
№ 1	5,105	33,434	219,711	33,424
№ 2	3,786	13,096	45,403	13,093
№ 3	1,071	3,382	10,673	3,381

Примечание. Пояснения относительно Dv(10), Dv(50) и Dv(90) см. в примечании к таблице 2.

Следует отметить, что измельчение твердых частиц, имеющих кристаллическую структуру, оказывается менее эффективным, чем диспергирование жидких частиц масляной фазы эмульсий (таблицы 2 и 3). В связи с этим была использована комбинированная технология, сочетающая изогидрическую кристаллизацию и диспергирование, при которой эффективность диспергирования существенно возрастает даже при низкой частоте вращения ротора – 5000 об/мин. При этой технологии средний объемный размер частиц уменьшается почти в 10 раз, а наибольший размер частиц в 90%-й фракции – в 20,6 раза, то есть эффективность диспергирования возрастает примерно в 4 раза и приближается к таковой жидкой фазы.

В эксперименте было использовано труднодиспергируемое лекарственное вещество нефопам (рисунок 7, таблица 6).

Обработка суспензии нефопама в ПЭО-400 на диспергаторе Megatron® в течение 1 мин при частоте вращения ротора 25000 об/мин приводит к уменьшению среднего объемного размера частиц лишь в 1,6 раза, а наибольшего размера частиц в 90%-й фракции – в 2,1 раза. Комбинированная технология, сочетающая изогидрическую кристаллизацию нефопама с диспергированием его частиц в среде пропиленгликоля (ПГ), существенно повышает эффективность диспергирования, что видно из фотографий, представленных на рисунке 8. При частоте вращения ротора всего 5000 об/мин средний объемный размер частиц уменьшается в 4,2 раза, а наибольший размер частиц в 90%-й фракции – в 4,1 раза.

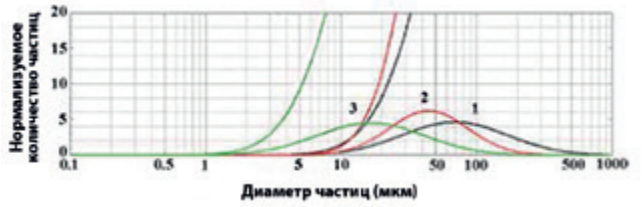


Рисунок 7. Распределение частиц дисперсной фазы по размерам в суспензиях нефопама исходно без диспергирования (1), после диспергирования в среде ПЭО-400 в течение 1 мин с помощью Megatron® при частоте вращения ротора 25000 об/мин (2) и при сочетании изогидрической кристаллизации с диспергированием в среде ПГ при частоте вращения ротора 5000 об/мин (3)

Таблица 6.

Некоторые параметры, характеризующие распределение частиц по размерам в суспензиях нефопама исходно без диспергирования (1), после диспергирования в среде ПЭО-400 при частоте вращения ротора 25000 об/мин (2) и при сочетании изогидрической кристаллизации с диспергированием в среде ПГ при частоте вращения ротора 5000 об/мин (3)

Режим обработки	Наибольший диаметр частиц во фракции, мкм			Средний объемный диаметр, мкм
	Dv(10)	Dv(50)	Dv(90)	
№ 1	21,815	68,677	215,993	68,666
№ 2	18,702	44,126	103,718	44,121
№ 3	5,150	16,543	53,288	16,539

Примечание. Пояснения относительно Dv(10), Dv(50) и Dv(90) см. в примечании к таблице 2.

Если после начала кристаллизации отсутствует эффективное диспергирование образующихся кристаллов, то при медленном охлаждении проявляется термодинамическая неустойчивость суспензии, связанная с осаждением растворенного нефопама на образовавшихся частичках и с перекристаллизацией мелких частиц в крупные (рисунок 8).

Диспергатор Megatron® позволяет эффективно измельчать дисперсную фазу суспензий. В зависимости от свойств лекарственного вещества следует осу-

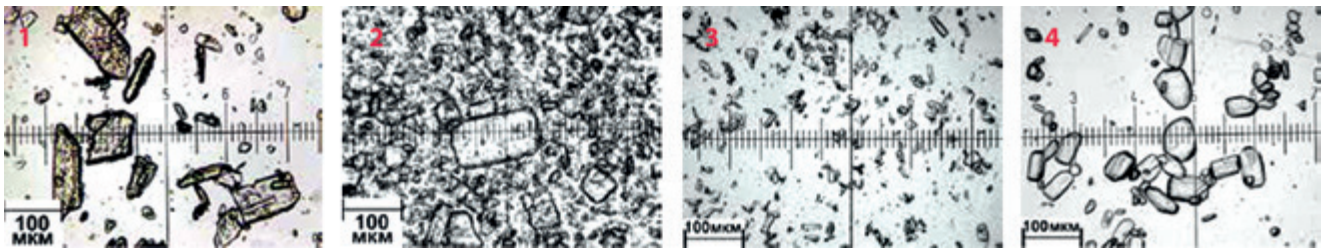


Рисунок 8. Микрофотографии суспензии нефопама исходно (1), после диспергирования в среде ПЭО-400 в течение 1 мин при частоте вращения ротора 25000 об/мин (2), при сочетании изогидрической кристаллизации с диспергированием в среде ПГ при частоте вращения ротора 5000 об/мин (3), при изогидрической кристаллизации из ПГ без диспергирования (4)

ществлять выбор рациональной технологии и подходящей жидкой среды для диспергирования, которые могут существенно повысить эффективность диспергирования. Уменьшение размера частиц и сужение диапазона их распределения по размерам представляется важным для достижения однородности суспензий, их термодинамической и седиментационной устойчивости, а также стандартизации размера частиц (при условии использования адекватной технологии и правильно выбранного состава дисперсионной среды, которые не приводят к перекристаллизации лекарственного вещества).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Диспергатор Megatron® MT 1-50 SHS F/2 производства компании Kinematica AG (Швейцария) является эффективным техническим средством, использование которого в технологии эмульсий типа м/в позволяет изготавливать ультрамикрогетерогенные системы со средним размером частиц около 1 мкм и узким диапазоном распределения частиц масляной фазы по размерам, что может иметь существенное значение для качества, эффективности и безопасности лекарственных препаратов и косметических средств.
2. Использование диспергатора Megatron® MT 1-50 SHS F/2 в технологии суспензий обеспечивает существенное уменьшение размера частиц дисперсной фазы и сужение диапазона их распределения по размерам, что может иметь большое значение для стабильности суспензий, а также качества, эффективности и безопасности лекарственных препаратов и косметических средств.
3. Для повышения эффективности диспергирования твердых частиц следует правильно выбирать жидкую среду для диспергирования и при необходимости комбинировать конденсационные методы изготовления суспензий (в частности, изогидрическую кристаллизацию) с диспергированием с помощью диспергатора Megatron® MT 1-50 SHS F/2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8): Настанова СТ Н МОЗУ 42 3.0:2011. [Чинна від 2011-10-03]. – К.: МОЗ України, 2012. 36 с.
2. Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності: Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.2:2004. [Чинна від 2004-04-1]. – К.: МОЗ України, 2004. 42 с.
3. Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая, И.А. Зинченко, А.Н. Ляпунов, Ю.М. Столпер. Мягкие лекарственные средства: фармацевтическая разработка и трансфер технологии // Фармацевтическая отрасль. 2014. № 5 (46). С. 22–33.
4. Martindale: The Complete Drug Reference. 36th Edition / Ed. Sweetman S.C. – London: Pharmaceutical Press, 2009. 3694 p.
5. European Pharmacopoeia. 8th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). – Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2013. 3655 p.
6. Pharmaceutical Excipients / Eds. R.C. Rowe, P.J. Sheskey, S.C. Owen. – London: Pharmaceutical Press, 2006. 322 p.
7. N.A. Pinchukova, N.A. Lyapunov, E.P. Bezuglaya et al. Effect of different particle size reduction techniques on the nefopam and acyclovir dispersity // Functional Materials. 2015. V. 22. № 4. P. 535–542.
8. А.Н. Ляпунов, Е.П. Безуглая, Н.А. Ляпунов. Исследование высвобождения мелоксикама из мягких лекарственных средств в опытах in vitro методом диализа через полупроницаемую мембрану // Фармаком. 2016. № 2. С. 33–42.
9. А. Адамсон. Физическая химия поверхностей. – М.: МИР, 1979. 568 с.

KINEMATICA AG
Dispersing and Mixing Technology

ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

АВТОР

М.В. Дунаева,

Менеджер
по продукции Anton Paar
АО «АВРОРА»

ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты широко используются в фармацевтической и пищевой промышленности. Оптическое вращение зависит от pH, поэтому фармакопеи Европы и США требуют проводить поляриметрический анализ аминокислот при различных значениях кислотности.

АМИНОКИСЛОТА: ОСНОВАНИЕ ИЛИ КИСЛОТА?

Аминокислоты являются строительными блоками белков и имеют в своей структуре карбоксильную группу, аминогруппу и определенный радикал. Протеиногенные аминокислоты преимущественно существуют в виде альфа-аминокислот, которые несут карбоксил, амин, водород и радикал на альфа-углероде (рисунок 1). Этот α-углерод образует хиральный центр. Из-за этого хирального центра большинство альфа-аминокислот являются оптически активными, за исключением простейшей аминокислоты глицин (R=H).

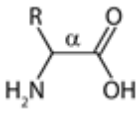


Рисунок 1. Общая структура α-аминокислот

В отличие от сахаров, которые существуют только в высших организмах в природе в D-конформации, протеиногенные аминокислоты имеют L-конформации в проекции Фишера. Только отдельные прокариоты могут использовать D-аминокислоты.

В кислых растворах аминокислоты существуют в виде катионов, поскольку они несут по меньшей мере один положительный заряд, в то время как в щелочном растворе аминокислоты заряжены отрицательно (рисунок 2).

При определенном pH карбоксильная группа становится депротонированной группой амина (рисунок 2). В этом состоянии аминокислота является цвиттер-ионом – молекулой, содержащей противоположно заряженные группы (от немецкого слова «гибридный ион»). При заданном pH достигнута изоэлектрическая точка – суммарный заряд всех молекул аминокислоты равен нулю. Таким образом, заряд аминокислоты и, следовательно, его геометрическая структура у хирального центра сильно зависит от pH раствора. Поскольку геометрическая структура зависит от величины pH, то оптическое вращение аминокислоты сильно зависит от величины pH раствора (рисунок 3).

При измерении оптического вращения международные фармакопеи требуют измерения аминокислот в определенных растворах, чтобы обеспечить формирование сопоставимых результатов.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

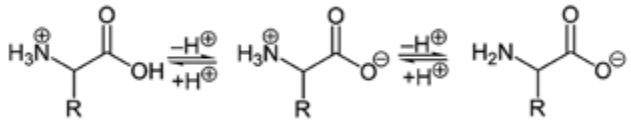


Рисунок 2. В зависимости от pH аминокислоты существуют либо в виде аниона, либо цвиттер-иона, либо катиона

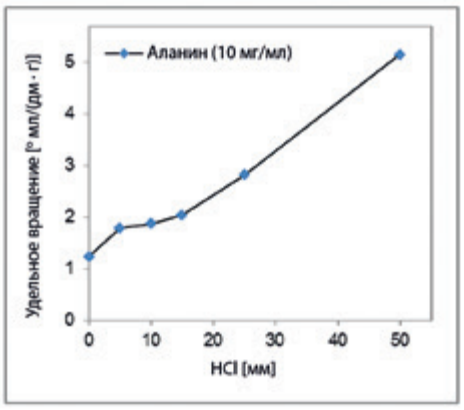


Рисунок 3. Удельное вращение аланина при 589 нм в диапазоне концентрации от 0 до 50 мМ HCl

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Аминокислоты легко растворяются в водных растворах и изменяют свою геометрическую структуру по отношению к pH. Концентрации HCl и NaOH в необходимом растворителе должны быть точно отрегулированы, для того чтобы получать сравнимые значения оптического вращения в соответствии с требованиями международных фармакопей.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Этот метод не содержит каких-либо указаний по технике безопасности. Ответственность по установлению соответствующих правил безопасности и гигиены труда, а также определение применимости нормативных ограничений перед использованием этого метода возлагаются на пользователя данного метода.

МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТЫ

Рисунок 4 Поляриметры MCP от Anton Paar – идеальное решение для анализа аминокислот

Материалы

- бидистиллированная вода;
- в зависимости от метода и образца: раствор HCl и/или NaOH;
- аминокислота;
- поляриметр MCP 100/150/200/300/500 с контролем температуры на элементах Пельтье;
- поляриметрическая трубка 100 мм с опцией Toolmaster™;
- предпочтительный материал ячейки – Hastelloy B3, который устойчив к высококонцентрированным кислотам (до 35% HCl).

Метод

Поскольку оптическое вращение аминокислот в значительной степени зависит от кислотности растворителя, международные фармакопеи требуют измерения оптического вращения аминокислот в определенных условиях. В этих требованиях указаны температура, длина волны и длина оптического пути, а также качество растворителя и концентрации аминокислоты при измерении удельного вращения.

Удельное вращение $[\alpha]_{\lambda}^{T}$ является мерой оптического вращения α при определенной концентрации *c*, равной 1 г/100 мл, длине пути *l*, равной 1 дм, длине волны D-линии натрия (589 нм) и температуре 20 °C:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l}.$$

Функция Toolmaster™ напрямую передает точную длину ячейки и температуру образца в прибор, что позволяет точно определить как конкретное оптическое вращение, так и удельное вращение в соответствии с международными фармакопеями.

ЛИТЕРАТУРА

1. European Pharmacopoeia monographs, focusing on optical rotation, tyrosine, tryptophan and alanine. URL: https://www.edqm.eu/medias/fichiers/NEW_Guide_for_the_elaboration_of_monographs_on_syn.pdf (дата обращения 15.10.2016)
2. M. Pecul, K. Ruud, A. Rizzo, T. Helgaker. Conformational Effects on the Optical Rotation of Alanine and Proline // J. Phys. Chem. A. 2004. № 108. P. 4269–4276.
3. M. Loudon. Organic Chemistry. – Oxford: University Press,Inc. 2002. 312 p.

Anton Paar

СИСТЕМА МИКРОНИЗАЦИИ PM8 В СТЕРИЛЬНОМ ИСПОЛНЕНИИ

Материал предоставлен компанией FPS

ВВЕДЕНИЕ

Итальянская компания FPS (Food and Pharma Systems) – один из мировых лидеров в области разработки и изготовления систем микронизации и барьерных технологий (для стерильных или высокотоксичных АФИ) в фармацевтике и промышленности высокочистых химических реактивов. Более 15 лет сотрудники FPS разрабатывают индивидуальные решения и поставляют изоляторы и системы микронизации на фармацевтические заводы, предприятия химической и косметической промышленности по всему миру, гарантируя качество и поддержку во всех видах деятельности: консалтинг, инжиниринг, производство, испытания, квалификация, техническое обслуживание в строгом соответствии со стандартами cGMP в рамках сертифицированной системы качества ISO9001.

Одним из самых важных проектов, которые компания реализовала в 2016 году, стало создание промышленной системы микронизации в стерильном изоляторе. В июле оборудование было установлено на фармацевтическом производстве в Испании.

СТЕРИЛЬНАЯ СИСТЕМА МИКРОНИЗАЦИИ PM8

Оборудование имеет многоуровневую конструкцию и состоит из:

- перчаточного бокса для выгрузки партии продукта из фильтра-сушилки без нарушения стерильных условий внутри фильтра;

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

- изоляционного бокса для микронизации, обеспечивающего необходимый уровень защиты продукта в процессе тонкого размола;
- изоляционного бокса для выгрузки, оборудованного воздушными шлюзами с ламинарным течением воздуха, для гарантии высокой степени стерильности.

Система полностью автоматизирована. Специализированное ПО FPS обеспечивает контроль всех функциональных возможностей оборудования. Стерилизация системы проводится как водяным паром, так и парами пероксида водорода.

Инновационная установка позволяет заказчику осуществлять различные этапы стерильного производства АФИ, избегая риска контаминации и минимизируя воздействие оператора на продукт.

Недавно модернизированный и значительно расширенный испытательный R&D-центр FPS [материал об испытательном центре был опубликован в № 2(15) май, 2016 г., С. 293–294] позволяет проводить технические испытания процессов микронизации малой и средней продолжительности и может быть использован для сотрудничества на различных условиях. Наличие трех помещений класса чистоты ISO8 позволяет обеспечить необходимую защиту как оператора, так и продукта, если, конечно, имеется такая необходимость.

Помещения R&D-центра оборудованы всеми необходимыми защитными устройствами и блокировками для проведения работ в атмосфере инертного газа.

В качестве альтернативы возможно выполнение технических испытаний на площадке конечного пользователя, – это особенно актуально, когда необходимо строго обеспечить определенные условия проведения процесса. Для таких задач возможна аренда оборудования с обеспечением всей необходимой технической поддержки. Для обеспечения инертных условий или при необходимости обработки токсичного продукта на условиях аренды также доступен изолятор FPS.

Основной принцип компании: не просто повысить свою компетентность и улучшить технические характеристики производимого оборудования, но решать вместе с клиентом новые, уникальные задачи в химии и фармацевтике.

Семинар-презентация FPS

«Новейшие технологии в микронизации и смешивании, уникальная система помола внутри изолятора от FPS»

FPS FOOD PHARMA SYSTEMS

Технический специалист отдела продаж компании FPS Stefano Butti и инженер–технолог ГК «Фармконтракт» Дмитрий Ткач представят сравнительный анализ современных систем измельчения и микронизации, а также познакомят с новыми подходами обеспечения высочайшего класса защиты технологических процессов/персонала.

23 ноября
с 16.20 до 17.20
г. Москва, МВЦ "Крокус Экспо", павильон 2, зал 7, Стенд А373

УЧАСТИЕ В СЕМИНАРЕ БЕСПЛАТНОЕ!

Ключевые вопросы семинара:

- Обзор мельниц FPS: спиральные струйные мельницы, QMills, механические мельницы и мультимелющие платформы
- Изоляторы для измельчения и микронизации
- Изоляторные технологии в производстве и переработке высокоактивных фармацевтических субстанций (ВАФС/HPAPI)
- Барьерная система для пилотного производства АФС
- Стерильные изоляторы и системы RABS
- Изолятор для проведения теста на стерильность
- Системы герметичной выгрузки для безопасной разгрузки, взвешивания и упаковки порошкообразных субстанций

ВНИМАНИЕ! Для участия в семинаре необходимо пройти регистрацию!

По вопросам регистрации на семинар обращайтесь к эксклюзивному дистрибьютору FPS в России ГК "Фармконтракт" по тел.: +7 (495) 252–00–98 или по e–mail: infopress@phct.ru

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИ АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ

АВТОР

В. Шунтиков,
Руководитель направления Metrohm
АО «АВРОРА»

ВВЕДЕНИЕ

Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) играют важнейшую роль в любой лаборатории контроля качества лекарственных средств. С другой стороны, ионообменная хроматография – одна из разновидностей ВЭЖХ – относительно молодой метода анализа, который получил активное развитие в 80-х годах XX века. Одним из пионеров производства ионных хроматографов является фирма Metrohm AG, имеющая более чем 25-летний опыт в области разработки и производства данных приборов. Кроме того, специалистами Metrohm AG по всему миру описано более 1000 применений метода ионной хроматографии для различных областей промышленности и исследований, включая фармацевтические и химико-биологические, применения.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

В настоящее время метод ионообменной хроматографии нашел свое применение в большом количестве фармацевтических статей и отражен, например, более чем в 70 USP-NF монографиях.

ИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

Ионная хроматография (ИХ) – метод, который позволяет определять активные фармацевтические ингредиенты, вспомогательные вещества и следовые количества примесей, а также метаболиты в форме органических или неорганических ионов или полярных веществ. Метод применим для различных фармацевтических препаратов, растворов и физиологических жидкостей. За один анализ и достаточно короткое время возможно определить различные, даже химически схожие компоненты образца. Анализируемые концентрации варьируются в пределах от нг/л до нескольких процентов. Большой выбор разделительных колонок и типов элюирования позволяет использовать метод ИХ для широкого спектра анализируемых веществ.

Современные системы также позволяют устранять негативные эффекты матрицы образца, в том числе и в полностью автоматическом режиме. Помимо этого, автоматизация метода предоставляет и другие преимущества: снижение рисков ошибки лаборанта, возможности перекрестного загрязнения.

В зависимости от требований к анализу и матрицы образца метод ионной хроматографии предлагает несколько вариантов детектирования.

- Кондуктометрическое детектирование (с подавлением фоновой электропроводности или без него).
- Электрохимическое детектирование.
- Спектрофотометрическое детектирование в УФ-ВИС-области спектра (с постколоночной дериватизацией или без нее).
- Комбинированные методы детектирования, например ИХ-МС или ИХ-ИСП-МС.

Многообразие типов фармацевтических проб приводит к различным подходам в ионной хроматографии. В данной статье приведен обзор наиболее часто встречающихся типов и примеры анализов.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ РАСТВОРЫ

Термин «фармацевтические растворы» включает в себя изотонические, гемодиализные или инфузионные растворы. Они содержат анионы, катионы, углеводы и органические кислоты, концентрации которых могут отличаться на несколько порядков. Для мониторинга производства и контроля качества конечной продукции требуется метод анализа, который может провести данное определение с высокой степенью точности. А кроме этого, анализ должен быть быстрым, точным и требовать минимальных трудозатрат. Современное исполнение данного метода ионной хроматографии позволяет полностью удовлетворить данным требованиям.

Два примера анализа гемодиализных растворов показаны на рисунках 1 и 2. Процедура гемодиализа используется для внепочечного очищения крови при лечении больных почечной недостаточностью. В ходе процесса происходит очистка крови от токсинов, содержащихся в крови больного. Данный метод основан на принципе проникновения веществ через полупроницаемую мембрану. Состав диализного раствора значительно влияет на ход всей

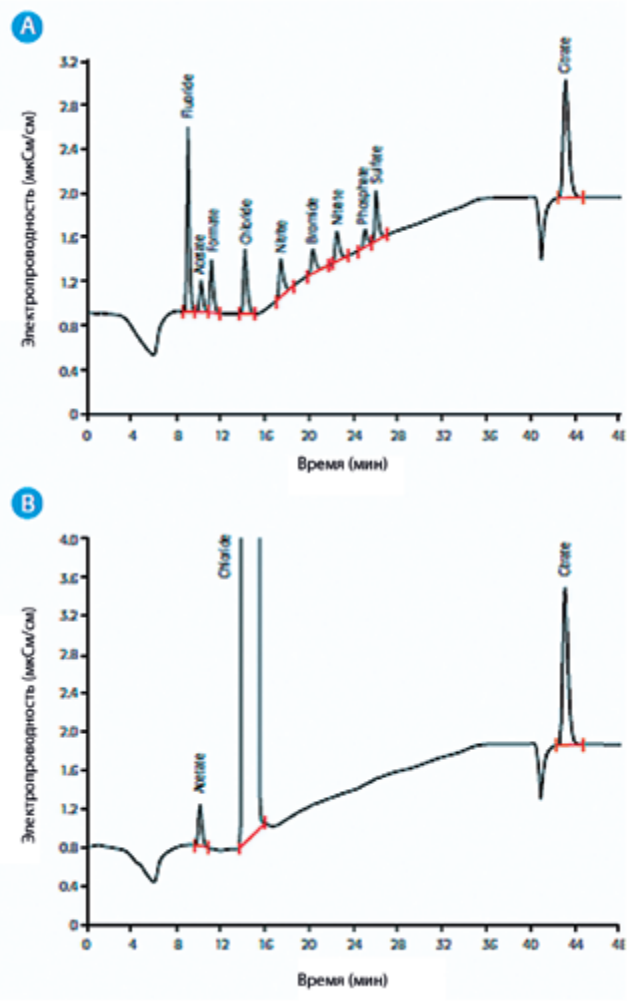


Рисунок 1. Измерение на колонке Metrosep A Supp 7 – 250/4.0 с помощью градиентного элюирования (Na_2CO_3), кондуктометрическое детектирование, последовательное подавление: A – стандарт анионов, включая ацетат и цитрат; B – ацетат и цитрат в гемодиализном растворе

процедуры, так как сильное изменение осмотической активности может привести к неблагоприятным последствиям.

На рисунке 1 продемонстрировано одновременное определение цитрата и ацетата в разбавленном растворе для гемодиализа. Анализ стандарта анионов и образца показаны на рисунках 1A и 1B соответственно. Ацетат добавляется в качестве буферного вещества, а цитрат – антикоагулянта. Во время гемодиализа они переносятся в кровь пациента и стабилизируют значение pH крови. Это необходимо, поскольку почки у диализных больных не способны выделять кислотные вещества.

Помимо цитрата и ацетата, на хроматограмме показано наличие хлоридов, близких к физиологическим концентрациям. При использовании физиологических концентраций растворенных веществ градиент концентрации сводится к минимуму, а динамическое равновесие достигается между кровью и диализным раствором. Таким образом, предотвращается растворение некоторых веществ в крови.

Определение катионов в гемодиализном концентрате показано на рисунке 2 с использованием инлайн-разбавления образца. Как и хлорид, катионы присутствуют в близких к физиологическим концентрациям, чтобы избежать их оттока из крови пациентов.

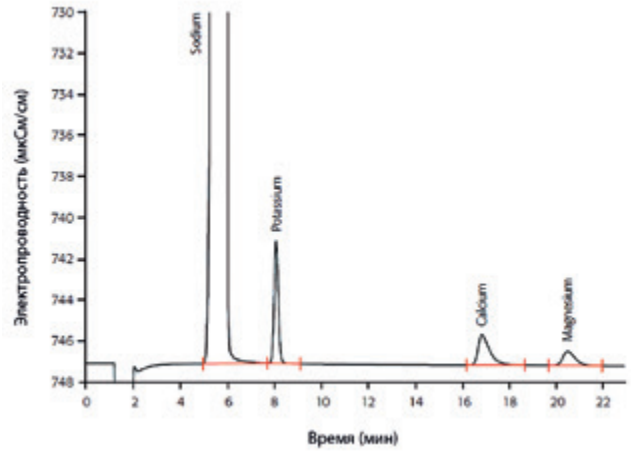


Рисунок 2. Определение катионов в гемодиализном растворе на колонке Metrosep C 4 – 150/4.0, кондуктометрическое детектирование без подавления

АКТИВНЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ИНГРЕДИЕНТЫ

В соответствии с правилами Ph. Eur и USP такие активные фармацевтические ингредиенты (API), как гентамицин, неомицин, цефадроксил или бетанехола хлорид, могут быть определены с помощью ИХ. Требования точности, разделения и извлечения веществ подробно описаны в фармакопеях. На рисунке 3 изображена хроматограмма анализа гентамицина, антибиотика из группы аминогликозидов. Аминогликозиды являются бактерицидными антибиотиками, которые блокируют биосинтез бактериального белка путем связывания с рибосомами, тем самым вызывая ошибки в трансляции РНК в ДНК. Гентамицин состоит из нескольких родственных соединений, а именно: гентамицина C_1, гентамицина C_{1a} и гентамицина C_2, C_{2a} и $C_{2б}$. Несмотря на их структурное сходство, ИХ позволяет достичь хорошего разделения различных компонентов гентамицина.

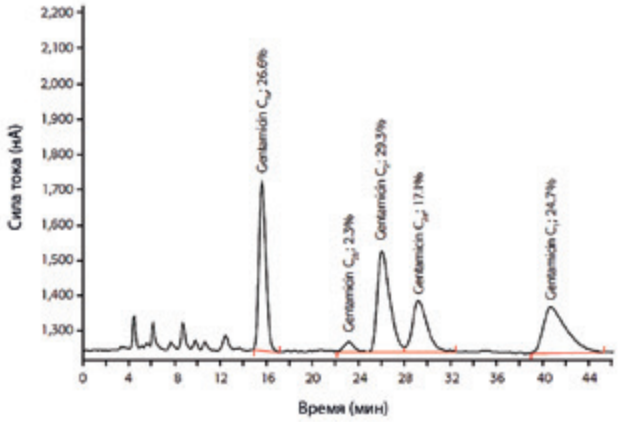


Рисунок 3. Определение гентамицина на электрохимическом детекторе, колонке Polymer Laboratories RP-S; элюент: 60 г/л Na_2SO_4, 1,75 г/л натрия октансульфонат, 1,34 г/л NaH_2PO_4, 8 мл/л ТГФ (pH=3, H_3PO_4); постколоночная добавка: 300 ммоль/л NaOH

ПРИМЕСИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Помимо анализа API, ионная хроматография позволяет проводить определение примесей в фармацевтической продукции. Это достаточно важно, так как даже небольшие концентрации примесей могут вызвать значительные побочные эффекты. Например, при синтезе ирбесартана в качестве примесей может содержаться азид, токсичное вещество, концентрация которого требует строгого контроля. Фармакопея США рекомендует метод ионной хроматографии для определения азида в соответствии с USP 621. В данном методе используется раствор, состоящий из элюента для ИХ и органического растворителя, который используется для удаления API из аналитической колонки. Тем не менее эта процедура утомительна, занимает много времени и не может быть автоматизирована.

Таблица 1.

Анализ азида: точность и воспроизводимость

	Площадь пика		
	Среднее значение (мкСм/см)	СКО (%)	Сходимость (%)
5 мкг/л	0,4223	1,96	101,71
30 мкг/л	2,5754	0,14	103,38

Примечание: *n*=3 измерения.

Определение азидов является более селективным, чувствительным и прежде всего быстрым с использованием инлайн-удаления матрицы образца. Хроматограмма анализа ирбесартана показана на рисунке 4 и в таблице 1, где представленны результаты трех измерений азида, полученые с помощью кондуктометрического детектирования с последовательным подавлением.

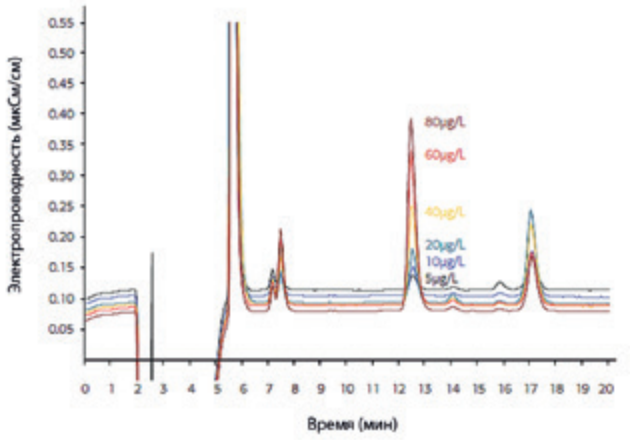


Рисунок 4. Образец ирбесартана с добавками 5–80 мкг/л азида; колонка Metrosep A Supp 10 – 250/4.0; элюент: 5 ммоль/л Na_2CO_3, 5 ммоль/л $NaHCO_3$; инлайн-удаление матрицы образца с помощью раствора 70:30 (об) метанол/вода

Определение азида в ирбесартане с удалением матрицы образца в качестве пробоподготовки соответствует всем требованиям регулирующих органов в части селективности метода, пределов обнаружения, количественного анализа, точности, линейности, воспроизводимости и т.д. Таким образом, данный метод может быть использован в качестве более быстрой и чувствительной альтернативы USP 621.

Таблица 2.

Примеры применения ионной хроматографии в анализе фармацевтических препаратов

Фарм. субстанция	Анализируемое вещество		Детектирование
Адреналин	Адреналин	API	Электрохимическое
Ибупрофен	Ибупрофен, валерофенон	API	Кондуктометрическое
Золедроновая кислота	Фосфит, фосфат	Примесь	УФ/ВИС

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день метод ионной хроматографии нашел широкое применение в фармацевтической промышленности. Помимо описанных в данной статье методик, в таблице 2 сделана выборка трех из более чем 80 применений. Данный метод становится все более универсальным благодаря наличию большого числа разделительных колонок, вариантов элюирования и доступных методов автоматической пробоподготовки.

Metrohm

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ ДЛЯ СКРИНИНГА ГИБРИДОМ

Материал предоставлен компанией Merck

ВВЕДЕНИЕ

Как формируются антитела? Иммунный ответ является сложным процессом взаимодействий между лимфоцитами и специальными агентами, называемыми цитокинами и хемокинами, в результате которого В-лимфоциты начинают продуцировать в кровь специфические антитела против конкретного антигена. В-лимфоциты имеют на своей поверхности рецепторы, которые аналогичны антителам и которые, взщаимодействуя с антигеном, стимулируют начало биосинтеза антител.

Как получаются антитела для нужд человека? Этот процесс является стадийным. Начинается он с того, что иммунизируют животных: производят несколько инъекций антигена в присутствии стимуляторов иммунного ответа в сыворотке крови, в результате чего накапливаются специфические антитела. Антитела выделяют из сыворотки в виде иммуноглобулинов G, осуществляя осаждение сыворотки крови с помощью сульфата аммония, спирта, полиэтиленгликоля и других веществ. Эта фракция антител содержит много примесных белков. С помощью ионообменной хроматографии получают высокоочищенные антитела.

Препараты на основе антител получить достаточно сложно, поскольку их состав зависит от разных характеристик: видоспецифичности животных, их индивидуальных особенностей, цикла иммунизации и ряда других факторов. С другой стороны, для современной иммунологии очень важна специфичность – способность выделить именно данный субстрат в сложных биологических жидкостях, таких как сыворотка или плазма крови, цереброспинальная жидкость, слюна, слеза, клеточный лизат и проч. Это осуществляется с помощью иммунохимических методов, в которых используются антитела, специфично реагирующие по принципу «антиген – антитело». Для осуществления таких анализов нужны абсолютно идентичные антитела, которые неприемлемо синтезировать обычным способом.

МЕТОДИКА СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ГИБРИДОВ

Эту проблему в 1975 году разрешили английские ученые Георг Кёлер и Цезарь Мильштейн с помощью разработанной ими методики создания клеточных гибридов – гибридом. Гибридома – это результат слияния лимфоцитов, которые были получены от иммунизированных животных, с клетками миеломы костного мозга, культивируемыми *in vitro*.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Иммунизация животного в ответ на введение антигена активизирует продуцирующие антитела В-лимфоциты, которые могут жить только в организме хозяина и при переносе на искусственную питательную среду они не выживают. Если осуществить слияние иммунной клетки с опухолевой, образуются гибридные клетки, процесс иммортализации, то есть возможность жить неограниченно долго в искусственных средах и продуцировать антитела.

Гибридомы, которые продуцируют определённые антитела, отбирают на селективных ростовых средах. После этого их помещают в культуральную жидкость, где они образуют клон – совокупность родственных клеток. Эти клоны синтезируют антитела, которые называют моноклональными. Это идентичные по структуре и специфичности антитела, которые можно продуцировать в неограниченных количествах.

Секрецию антител определяют различными методами скрининга супернатантов гибридом, то есть проводят анализ той культуральной среды, в которой рос конкретный клон. Необходимость раннего скрининга гибридом обосновывается рядом причин. Во-первых, после отмирания неслившейся миеломы популяция делящихся клеток может содержать в себе гибридомы, секретирующие антитела к постороннему антигену либо антитела к требуемому антигену, но неудовлетворительной аффинности. Во-вторых, небольшая часть миеломных клеток может выжить на селективной среде вследствие обращения мутантного гена в нормальный, свободные от секреции такие ревертанты быстро перерастут гибридомы-продуценты антител. В-третьих, после гибридизации клетки приобретают дополнительный хромосомный набор, что делает клетку генетически неустойчивой. Это приводит к активным геномным перестройкам и выбросу лишних хромосом в первые дни и недели после гибридизации. Клетка, лишившаяся таким образом обременительной для себя секреции антител, опередит в росте секретирующие клетки.

НАБОРЫ RAPIDQUANT

Компания Merck, которая является ведущим разработчиком экономически эффективных и доступных систем клеточного анализа для научных исследований, биофармацевтики и клинической диагностики, предложила наборы для скрининга гибридом под названием RapidQuant. Это линия наборов на основе микросфер, предназначенных для количественного определения мышиных либо человеческих антител на основе иммуноглобулина G.

Наборы RapidQuant IgG для проточных цитометров guava easyCyte представляют собой удобный подход для количественной оценки антител. Они позволяют осуществлять удобную оценку гибридом на основе планшетного проточного цитометра вместо традиционных плашечных ридеров. Наборы guava RapidQuant IgG для анализа как человеческих, так и мышиных антител чрезвычайно упростили протоколы, которые требуют очень небольшой пробоподготовки и занимают значительно меньше времени для проведения анализа, чем традиционные протоколы ELISA – метода, который наиболее часто используется для количественной оценки антител. Эти наборы максимально оптимизированы для легкого использования на системе проточной цитометрии guava easyCyte.

Ученые, которые осуществляют разработку антител, часто должны анализировать сотни или тысячи клонов гибридом, чтобы выбрать клоны с правильной специфичностью и распознать те клоны, которые производят наибольшие количества антител. С наборами RapidQuant IgG ученые могут легко осуществить сравнение продукции IgG на больших количествах клонов гибридом, используя очень малые объемы супернатанта. Что еще более важно, набор RapidQuant IgG можно дополнить другими наборами guava easyCyte для исследований клеток, чтобы ускорить весь процесс скрининга антител, выполняя все стадии скрининга.

Исследования с помошью наборов RapidQuant IgG значительно уменьшают практическое время, необходимое для количественной оценки антител. Простота метода и адекватный динамический диапазон значительно снижают стоимость количественной оценки, одновременно уменьшая время, необходимое для анализа.

Наборы RapidQuant IgG были самыми первыми количественными наборами, основанными на анализе микросфер для систем проточной цитометрии guava easyCyte. Исследования с помощью наборов RapidQuant IgG обеспечивают быстрые, воспроизводимые и точные результаты в адекватном диапазоне скрининга культуры гибридом. Разработанные как универсальные наборы IgG, они количественно определяют все подтипы IgG, сохраняя время и деньги благодаря единому дизайну исследования.

Системы guava easyCyte для скрининга гибридом успешно зарекомендовали себя на рынке проточной цитометрии. Данные системы используются для этих целей в департаментах разработки лекарственных препаратов большинства крупнейших фармацевтических компаний по всему миру.

Системы guava easyCyte используют запатентованную, микрокапиллярную технологию, основанную на применении лазеров, способную детектировать клетки млекопитающих и насекомых, а также различные микрочастицы. Образец с флуоресцентно-меченными клетками отбирается в уникальную микрокапиллярную проточную ячейку. Красный, синий или фиолетовый лазер возбуждает молекулы флуорофоров, при этом каждая клетка испускает сигнал, который независимо детектируется светодиодом или фотоумножителем.

Программное обеспечение guava немедленно отображает достоверные данные и результаты.

В основе каждой системы guava easyCyte лежит запатентованная микрокапиллярная технология, исключающая необходимость в использовании проточной жидкости. Это приводит к снижению сложности прибора, меньшим затратам образца и минимальному образованию отходов, что сохраняет Ваше время и деньги. В дополнение к этому прибор содержит автоматически саморегулирующуюся проточную кювету с возможностью замены кюветы самим пользователем, что уменьшает затраты времени и денег на вызов сервисной службы. А также благодаря исключению сложной проточно-жидкостной системы прибор занимает минимальную площадь. Помимо этого, среди особенности системы стоит отметить следующие:

- не требуется настройка лазеров и использование проточной жидкости;
- использование малого количества исследуемого образца и продукция меньшего количества отходов;
- проточная кювета может быть заменена самим пользователем, что минимизирует время простоя прибора;
- забор образца непосредственно из пробирки.

Преимущества запатентованной микрокапиллярной технологии Guava:

- подсчет абсолютного числа клеток без наличия референсных частиц (волюметрический)
- 1/10 – 1/100х меньше образца
- 1/10 – 1/100х меньше реагентов
- 1/1000х меньше отходов
- 1/5 – 1/10х меньше обучение
- 1/4 – 1/10х меньше габариты
- Меньше затраты времени на техническое обслуживание.

УСТРОЙСТВО СИСТЕМ GUAVA EASYCYTE

Проточные цитофлуориметры guava easyCyte HT являются несложными приборами, способными проводить комплексный клеточный анализ прямо на рабочем столе. Один (синий – 488 нм), два (синий – 488 нм и красный – 642 нм) или три (синий – 488 нм, красный – 642 нм и фиолетовый – 405 нм) лазеры предоставляют возможность одновременной детекции до 12 параметров, включая 10 каналов детекции флуоресцентных красителей плюс прямое и боковое светорассеивание для определения размеров клеток и их гранулярности. В двух и трехлазерных системах, спектры пространственно перекрываются и модулируются с выходом сигналов в фазу высоких частот таким образом, что частицы многократно измеряются во время прохождения через перекрывающиеся лучи лазеров. Такая модуляция особенно важна для идентификации красителей с перекрывающимися спектрами эмиссии, таких как PE-Cy7 (возбуждение синим лазером) и APC-Cy7 (красный лазер). В отличие от пространственно разделенных лучей модуляция исключает необходимость в ежедневной калибровке, в целом упрощая работу с прибором. Приборы guava easyCyte™ HT обеспечивают высокую пропускную способность анализа, благодаря роботизированной загрузке образцов с помощью автоматической подачи из 96-ти луночного микропланшета или пробирки (до 10 пробирок), в тоже время как приборы guava easyCyte™ позволяют проводить обработку одного образца с дополнительной экономией денежных средств.

В основе каждой системы guava easyCyte™ лежит запатентованная микрокапиллярная технология, исключающая необходимость в использовании проточной жидкости и обеспечивающая подсчет абсолютного числа клеток без необходимости в использовании референсных частиц. Дополненная нашим интуитивным программным обеспечением, система обеспечивает гибкость в сборе и анализе данных с возможностью использования оптимизированных модулей или создания собственных.

HERMES M МАШИНА ДЛЯ УКУПОРКИ ФЛАКОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Материал предоставлен компанией Imaco Group

АННОТАЦИЯ

Компания Imaco Group (Чехия) – известный во всем мире производитель линий розлива нестерильных продуктов и машин тубонаполнения. Благодаря сильной технической базе и высококвалифицированным инженерам, доступной цене, высококачественному оборудованию и прекрасному сервису компания в короткие сроки стала одним из лидеров рынка Восточной Европы.

Imaco Group специализируется на производстве комплексных линий розлива и упаковки (как моноблочного, так и линейного принципа действия), машин тубонаполнения для продуктов различной консистенции и вязкости. Чешское оборудование может использоваться в потенциально взрывоопасных средах, работать с химически агрессивными средами (йодсодержащие продукты, щелочные, кислоты и проч.). Фармацевтическое исполнение линий розлива и тубонаполняющих машин обеспечивает соответствие производственной линии стандартам GMP.

ВВЕДЕНИЕ

Для герметизации закручивающими или насадочными крышками небольших ёмкостей до 5 л компания Imaco разработала укупорочную машину роторного типа Hermes M, которая подходит для укупорки различных видов емкостей, используемых в фармацевтической, химической и пищевой промышленности, винтовыми и насадными крышками

Все элементы машины, имеющие контакт с продуктом, выполнены из химически устойчивых нержавеющих сталей. Эти материалы нейтральны ко всем фасуемым продуктам и моющим растворам, не влияют на качество продукта. Обшивка корпуса машины выполнена из нержавеющей стали и оргстекла.

ПРЕИМУЩЕСТВА ЛИНИИ УКУПОРКИ HERMES СЕРИИ M

Отличительными особенностями новой укупорочной машины являются:

- Высокая эффективность и оптимальная работа.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

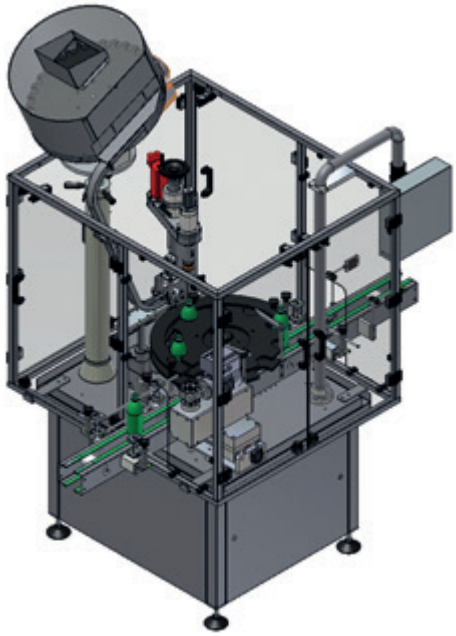
- Безопасность, обеспечивающаяся за счет функции остановки укупорки при отсутствии тары или крышек.
- Компактные размеры за счет роторного типа конструкции.
- Быстрая и точная укупорка (скорость регулируется).
- Быстрая перестройка машины под другой формат емкости или крышки.

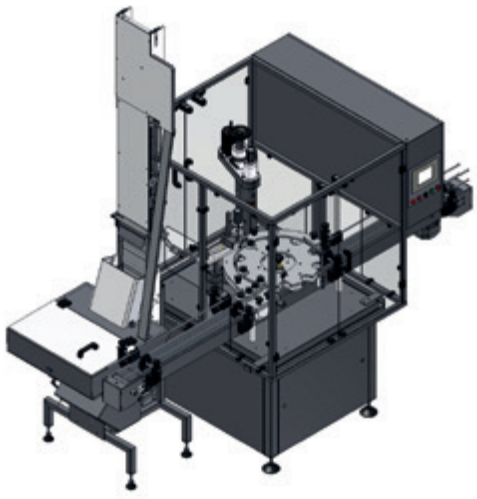
Технические характеристики:

Производительность	2500–3000 шт/ч
Размеры машины	1400 × 1400 × 2200 (длина x ширина x высота)
Вес машины	600 кг
Напряжение	3/N/PE, 3 × 400/230В, 50Гц
Максимальный ток	11А
Потребляемая мощность	7 kVA
Давление воздуха	6 бар

Решения для автоматической подачи и ориентации крышек:

- Ротационный бункер для крышек с ориентацией.
- Подъемный конвейер для крышек с ориентацией.





- Вибрационный бункер для крышек.

Выбор того или иного решения зависит от типа и сложности конструкции крышки.

ФУНКЦИЯ МАШИНЫ

Для укупорки контейнеры транспортируются подающим конвейером в звездчатое колесо (ротационный стол). Когда датчик определит положение бутылки, звездчатое колесо перемещает бутылку в позицию для надевания крышки, где ее зафиксирует. Подающий механизм захватывает крышку и вставляет ее в укупорочную головку, последняя съезжает вниз, закручивает и затягивает крышку. Необходимую силу затяжки можно наставить на укупорочной головке с помощью магнитной муфты. Закупоренная бутылка транспортируется звездчатым колесом к выводящему конвейеру.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Линия укупорки Hermes серии M производит установку крышек по принципу «Pick and place». С помощью автоматических машин закрутки/укупорки Hermes серии M можно упаковывать небольшие пластиковые, стеклянные флаконы и бутылки с различной продукцией для пищевой, фармацевтической, косметической и химической промышленности. Когда необходимо закрыть бутылку насадочной крышкой, на укупорочную головку подаётся давление, выталкивающее крышку через специальную пружину.

НАСКОЛЬКО КРИТИЧНОЙ ЯВЛЯЕТСЯ ЗАДЕРЖКА ВО ВРЕМЕНИ ПРИ СПРЕССОВЫВАНИИ МАТЕРИАЛА?

Материал предоставлен компанией Natoli

АННОТАЦИЯ

Масштабирование продукта с одного таблеточного пресса на другой при его разработке и дальнейшем производстве является актуальным вопросом на протяжении многих десятков лет. Существует ряд различных подходов и аспектов, которые необходимо рассмотреть при производстве таблеток, включая тип таблеточного пресса, дизайн и конструкции пуансонов, а также характеристики порошка.

ВВЕДЕНИЕ

При разработке новых лекарственных форм ученые используют небольшие лабораторные таблеточные прессы для изучения возможности формирования таблеток из имеющегося материала. Данные лабораторные системы очень эффективны при проведении исследований, но не всегда продукт, производимый при их помощи, может быть успешно адаптирован в крупных промышленных машинах. В идеале разработка продукта на производственном прессе позволит избежать возникновения затруднений при маштабировании продукта после проведения исследования на лабораторном прессе. Несмотря на все положительные стороны разработки продукта на промышленном прессе, не стоит забывать о том, что данная машина требует большого количества сырья, что значительно увеличивает уровень затрат.

Производство таблеток на роторном таблеточном прессе – это процесс, который включает в себя определенное количество этапов. Понимание функций данных этапов является жизненно важным и позволяет обеспечить производство качественных таблеток.

Этапы производства таблеток:

- Перемещение порошка из бункера в систему подачи порошка/сырья.
- Перемещение порошка из системы подачи продукта в полость матрицы.
- Правильная настройка наполняющего и дозирующего копиров.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

- Центробежное ускорение и движение по копиру.
- Предварительное прессование – необходимо ли (если да, то какова величина усилия)?
- Время и частота прессования.
- Задержка времени основного прессования.
- Декомпрессия при основном прессовании.
- Усилие и частота выталкивания.
- Удаление остатков гранулированного материала со стенок матриц и материала с поверхности таблеток.

Каждый шаг во время прессования таблеток – это отдельный пункт для обсуждения, тем не менее данная статья посвящена вопросу времени задержки при спрессовывании материала, а также влиянию конструкции таблеточного пресса и головок пуансонов непосредственно на сам процесс.

ОБСУЖДЕНИЕ

Время задержки, выраженное в миллисекундах, – это время, в течение которого пуансоны максимально углубляются в матрицы при помощи роликов основного прессования и больше не передвигаются вертикально. Другими словами, задержка возникает в то время, когда ролики прессования соприкасаются с плоской поверхностью головок пуансонов. Время задержки – это фактор, который напрямую влияет на прочность таблетки, а также является критическим параметром при трансфере (маштабировании) производства таблетки с одного таблеточного пресса на другой. Количество оборотов в минуту или количество таблеток в минуту – это показатель, который позволяет измерить скорость работы турели таблеточного пресса. Данный показатель не позволяет провести правильное сравнение таблеточных прессов с различными размерами турелей, тем не менее скорость турели является стандартом для определенного размера турели, а время задержки – для определенного размера турели и плоских головок пуансонов. Перед тем, как приступить к обсуждению времени задержки, необходимо понять скорость работы турели.

СКОРОСТЬ РАБОТЫ ТУРЕЛИ

Поперечная скорость (ПС/TV), которая выражается в мм/с, позволяет провести сравнение скорости работы прессов. Данный показатель является функцией скрости вращения (об/мин) турели и диаметра делительной окружности, который измеряется на турели от центра одной матрицы к центру противоположной матрицы (рисунок 1). Диаметр делительной окружности – это очень важный показатель, так как он обозначает область, в которой возникает компрессия.

В отдельных случаях скорость турели (об/мин) и поперечнная скорость зависят от диаметра делительной окружности, который в свою очередь изменяется в зависимости от количества станций на турели. На рисунке 3 изображены примеры машин различных размеров и взаимосвязь между скоростью турели об/мин) и поперечной скоростью.

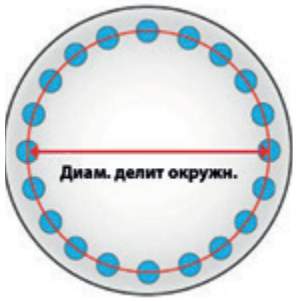


Рисунок 1. Диаметр делительной окружности турели

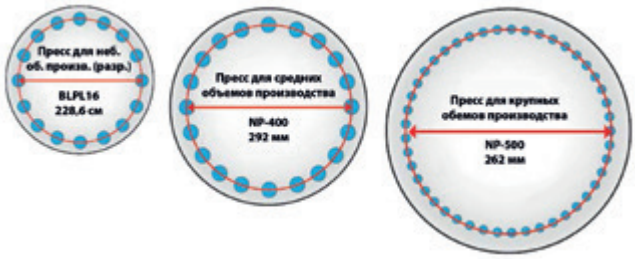


Рисунок 2. Примеры различных диаметров делительных окружностей

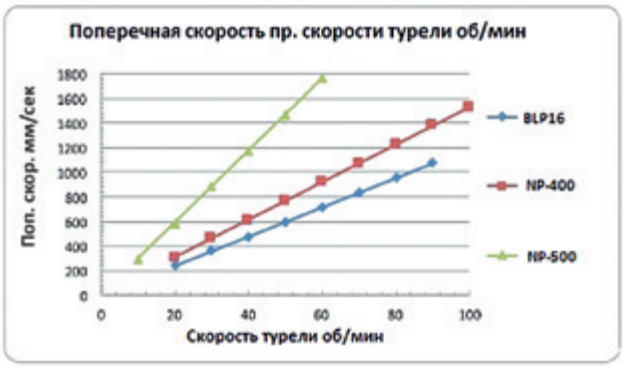


Рисунок 3. Поперечная скорость для прессов различных размеров

Для получения необходимого значения поперечной скорости скорость турели (об/мин) будет снижаться при увеличении делительного диаметра окружности. Значение скорости для производства в крупных объемах составляет свыше 1000 мм/с. При поперечной скорости в 1000 мм/с турель таблеточного пресса NP-500 будет работать на скорости 34 об/мин, турель пресса NP-400 – на скорости 65 об/мин, а турель пресса BLP-16 – на скорости 84 об/мин. Работа турели на скорости 84 об/мин может вызвать некоторые за-

трудненния при попадании порошка в полость матрицы, а также задержку при оценке атрибутов таблетки. Фактически некоторые промышленные таблеточные прессы для мелкосерийного производства (разработок) не способны достигать уровня производственной скорости из-за более маленького диаметра делительной окружности или ограничений по скорости (об/мин).

ПЛОСКАЯ ГОЛОВКА И ВРЕМЯ ЗАДЕРЖКИ

Головки оснастки для прессования оснащены плоской поверхностью, что позволяет обеспечить постоянный уровень деформации слоя порошка, который находится под роликами прессования. Для более длинной плоской поверхности необходимо большее время задержки (также в зависимости от характеристик деформации порошка и чувствительности к скорости деформации). Длительное время задержки может понадобиться при производстве прочных таблеток. Снижение скорости работы турели может повлиять на увеличение времени задержки, но это также повлечет за собой снижение уровня производительности.

Существует множество типов оснасток с различными конфигурациями головок, которые используются в промышленности. Некоторые типы оснасток специально разработаны для увеличения времени задержки, в то время как другие – для снижения преждевременного износа.

Наиболее распространенными конфигурациями оснасток являются европейский стандарт ISO и американский TSM. Использование данных стандартов позволяет обеспечить взаимозаменяемость оснасток таблеточных прессов, постоянный уровень качества при смене поставщика оснастки, упрощенную процедуру осмотра оборудования и сопутствующего инвентаря. Для этих стандартов типы оснасток «B» и «D» являются общими. Оснастка типа «B» специально разработана для размещения большего количества пуансонов в турели (за счет меньшего размера тела пуансона), что позволяет увеличить производительность. Оснастка типа «D» специально разработана для производства таблеток крупного размера (до 1 дюйма). Время задержки для оснастки типа «D» будет больше ввиду того, что оснастка типа «D» имеет более крупные головки и длинную плоскую поверхность для стандартной конфигурации. На рисунках 4 и 5 представлены данные о различных конструкциях головок с соответствующим временем задержки для данной поперечной скорости. Обратите внимание на то, что стандарт TSM Domed и стандарт EU 19 являются практически идентичными ввиду того, что профили их головок очень похожи. Также обратите внимание, что время задержки является менее чувствительным на более высокой скорости турели.

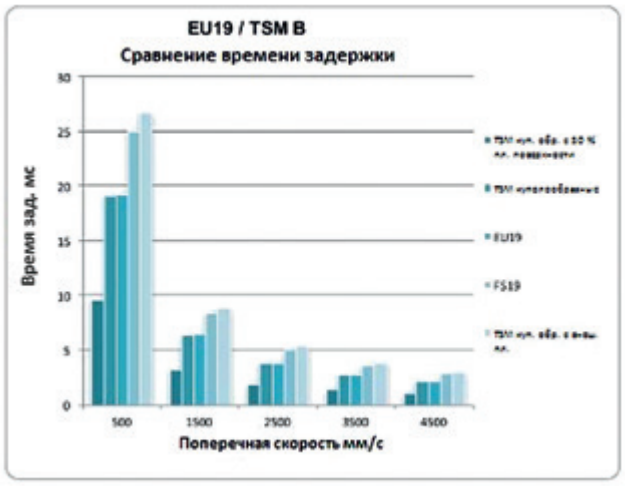


Рисунок 4. Сравнение времени задержек оснастки типа «B»

Рисунок 5. Сравнение времени задержек оснастки типа «D»

Время задержки может быть рассчитано по следующей формуле: размер плоскости головки пуансона делится на значение поперечной скорости турели. Эти простые расчеты очень полезны при переносе продукта на таблеточный пресс другого размера. В случае, если присутствует большой зазор поперечной скорости в небольшом таблеточном прессе для проведения испытаний и разработок и прессе для производства крупных партий, то плоская поверхность головок оснастки может быть специально спроектирована производителем оснастки таким образом, чтобы время задержки максимально соответствовало необходимому значению. Гибкость измерений плоской поверхности зависит от диаметра шейки пуансона. Для обеспечения надежности и целостности пуансона диаметр шейки должен быть больше размера плоской поверхности головки (с небольшим запасом).

На рисунке 6 изображен пример сравнения времени задержки производственного пресса (NP-500) и пресса для проведения исследований и разработок

(BLP16-D). Таблеточный пресс NP-500 – это высокоскоростная двухсторонняя машина на 45 станций с расширенной плоской поверхностью головок оснастки. Таблеточный пресс BLP16-D – это пресс на 16 станций с оснасткой типа «D». Пресс NP-500, работающий на 80% от максимального значения показателя скорости, развивает скорость в 50 об/мин для 17 мс времени задержки. С головками стандарта TSM (куполообразные) таблеточный пресс BLP16-D должен достигать скорости 80 об/мин для времени задержки 17 мс. В данном случае возможно возникновение затруднений при установке массы таблетки на высокой скорости. При использовании размера плоской поверхности 7,95 мм на таблеточном прессе BLP16-D необходимое значение скорости будет составлять всего лишь 40 об/мин, что является более приемлемым для формирования консистенции массы таблетки, а также позволяет снизить уровень отходов порошка.

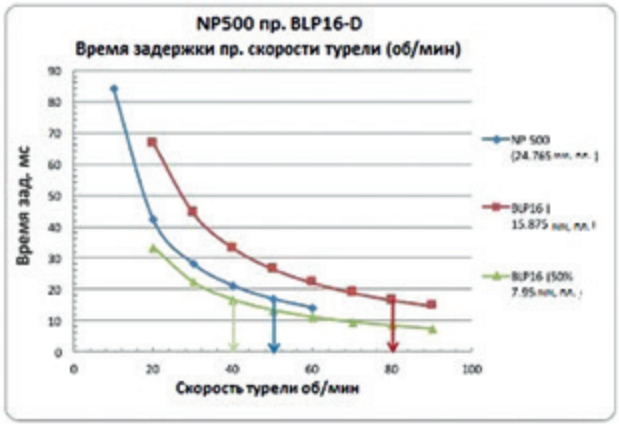


Рисунок 6. **Производственный пресс пр. пресса для разработок тип «D»**

Другая задача, которая может быть решена при помощи использования головок с плоской поверхностью, – это передача продукта из машины с оснасткой типа «B» в машину с оснасткой типа «D» или наоборот.

На рисунке 7 изображен пример сопоставления времени задержки от пресса NP-500 к прессу BLP-16 с оснасткой типа «B». Стандартная оснастка типа «B» достигает значение времени задержки пресса NP-500 при аналогичной скорости турели. При использовании 50% стандартных головок оснастки типа «B», скорость турели снижается до значения 25 об/мин, что позволяет значительно снизить уровень отходов порошка.

Как уже обсуждалось ранее, европейский стандарт ISO и американский стандарт TSM являются эталонными для спецификаций оснасток. Использование данных стандартов позволяет обеспечить приемлемый уровень допусков, что в свою очередь гарантирует правильную установку, выравнивание и надлежащую консистенцию таблеток. Приемлемый уровень

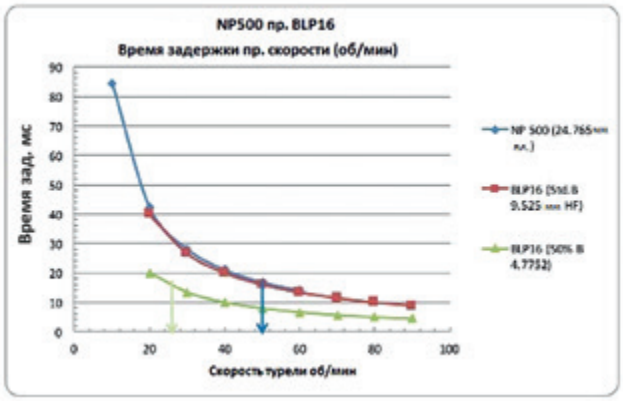


Рисунок 7. **Производственный пресс пр. пресса для разработок тип «B»**

допуска для плоской поверхности головки пуансона европейского стандарта составляет ±0,2 мм и +0,00/–0,76 мм для стандарта TSM. На рисунке 8 изображены разницы небольшого времени для европейских допусков. Для точного измерения размеров головок пуансонов можно использовать горизонтальное оптическое устройство сравнения.

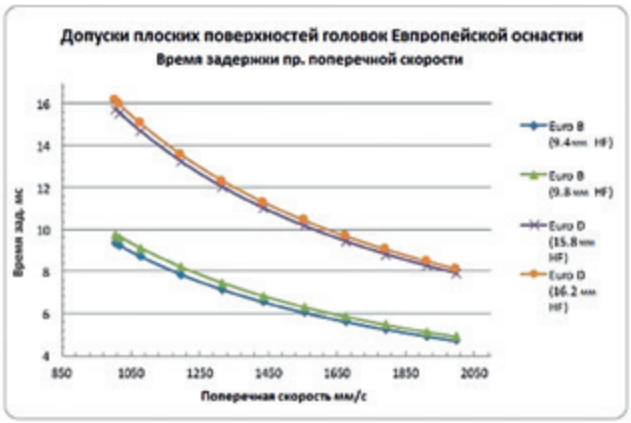


Рисунок 8. **Допуски головок пуансонов европейского стандарта и влияние на время задержки**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конструкция оснастки и время задержки являются одними из множества важных параметров, которые играют значительную роль в качестве таблетки. Плоские поверхности головок пуансонов могут быть спроектированы таким образом, чтобы обеспечивать максимальный уровень масштабируемости продукта при передаче или же для решения задач, которые могут быть связаны с прочностью таблетки. Стандартизация размера турелей и оснасток позволяет обеспечивать более полное понимание процессов и проводить сравнение таблеточных прессов различных размеров.

NATOLI

Ведущий мировой производитель пресс–инструмента теперь в России

Celebrating
40 YEARS
OF TABLETING EXCELLENCE IN...

ШИРОКИЙ АССОРТИМЕНТ ПРЕСС–ИНСТРУМЕНТА

стандартной формы, фигурный, многопозиционный, сборный со сменным штоком, для микротаблеток, в т.ч. для прессов IMA Comprima, Kilian, Fette, Korch, Bosch–Manesty, GEA и других

- Срок поставки по России от 6 недель
- Профессиональная консультация от ведущих специалистов
- Индивидуальный инжиниринг пресс–инструмента
- Точность изготовления и износостойкость
- Низкие эксплуатационные затраты
- Комплектующие и узлы для обслуживания инструмента

За дополнительной информацией обращайтесь к специалистам ГК «Фармконтракт»

+7 (495) 252–00–98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)

8 (800) 333–69–11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)

Pharmcontract® group of companies

www.phct–group.com

www.phct.ru

Эксклюзивный представитель Natoli Engineering в России

ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТА РАСТВОРЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЯЧЕЙКИ ПО МЕТОДУ USP 4

Материал предоставлен компанией SOTAX AG

ВВЕДЕНИЕ

Использование проточной ячейки для тестирования растворения таблеток и капсул не новая идея. Более 40 лет назад такой метод разрабатывался в лабораториях Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) и обсуждался с экспертами из Фармакопейного комитета США (USP). Сегодня процесс растворения с помощью проточной ячейки основывается на работах доктора Ф. Лангенбюхера и профессора Х. Мёллера и утвержден как метод USP 4. Также он был внесен в 1990-х годах в Европейскую и Японскую фармакопеи.

До сих пор, аппараты USP 1 и 2, оснащенные лопастной мешалкой или вращающейся корзинкой, являются наиболее часто используемым инструментом для анализа растворения. Здесь мы имеем фиксированный объем растворителя с максимумом в 2000 мл и стандартной температурой 37 °C.

Метод с использованием проточной ячейки использует неограниченное количество растворителя и предлагает ряд преимуществ по сравнению с устройством 1 и 2. При использовании проточной ячейки для тестирования растворения твердых лекарственных форм лекарственный продукт помещается в камеру (ячейку), через которую прокачивается среда растворения. Раствор образца фильтруется на выходе из ячейки и непосредственно анализируется или фракции собираются для последующего анализа.

Метод проточной ячейки является отличной альтернативой способам с мешалкой и корзинкой, особенно в тестировании лекарственных форм с длительным высвобождением и форм с низким содержанием активных ингредиентов. Условия достаточного разбавления (определяются как объем среды, по крайней мере, в три раза больший, чем требуется для формирования насыщенного раствора лекарственного вещества) могут быть легко достигнуты с использованием метода проточной ячейки – USP 4. Кроме того, в ходе испытаний легко выполняются изменения pH. Изменение растворителя производится с помощью клапана переключения одной среды на другую. Так как объем ячейки составляет всего лишь около 10 мл и типичная скорость потока 16 мл/мин, то требуется всего около одной минуты для полного изменения pH.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Процесс отбора пробы при использовании метода с лопастной мешалкой часто приводит к проблемам. Введение пробоотборника в стакан растворения может изменить гидродинамику и, следовательно, условия растворения. Кроме того, место отбора пробы должно быть всегда в одной и той же точке, чтобы гарантировать воспроизводимость результатов. При использовании проточной ячейки не существует никаких проблем, связанных с отбором проб. Ни контроль, ни автоматизированные манипуляции не нужны. Раствор образца автоматически фильтруется при выходе из ячейки и может быть проанализирован сразу после отбора пробы или после сбора образцов в коллектор фракций, без вмешательства оператора в процесс растворения.

При проведении анализа с использованием проточной ячейки лекарственную форму помещают в небольшой объем ячейки с точно определенными размерами. Размеры вместе с методом испытаний определены в фармакопее USP, глава 7241. На дно ячейки кладется рубиновый шарик, который выступает в качестве обратного клапана, а также предотвращает блокирование канала ячейки стеклянными шариками при их использовании.

В Американской Фармакопее прописаны два типа ячеек для таблеток диаметром 12 и 22 мм, в Европейской Фармакопее Eur.Ph. (часть 43) также прописаны форма и размеры ячейки для суппозиториев.

ТИПЫ ЯЧЕЕК НА ТЕСТЕРАХ SOTAX

С прибором SOTAX доступны шесть различных типов ячеек (рисунок 1), поршневой насос, который используется для прокачивания среды растворения с обычным расходом от 1,5 до 50 мл/мин и частотой 120±10 импульсов/мин. Частота пульсаций насоса остается постоянной, независимо от выбранной скорости потока; последнее определяется длиной хода поршня. Тем самым тип ячейки и скорость потока являются двумя наиболее важными параметрами в методе анализа.

Как правило, неограниченный объем среды прокачивается через ячейки и фильтруется сразу после выхода из ячейки через фильтрующую головку. Фильтрующий материал может быть выбран из широкого спектра доступных типов. Скорость высвобождения лекарственного средства зависит от скорости потока среды, и, следовательно, постоянный поток имеет важное значение.

Скорость потока среды во время испытания должна быть постоянной, даже если сопротивление фильтра увеличивается. Конструкция насоса должна быть в состоянии справиться с прокачиванием растворителя через широкий спектр типов фильтров, поддерживая синусоидальный профиль и по-

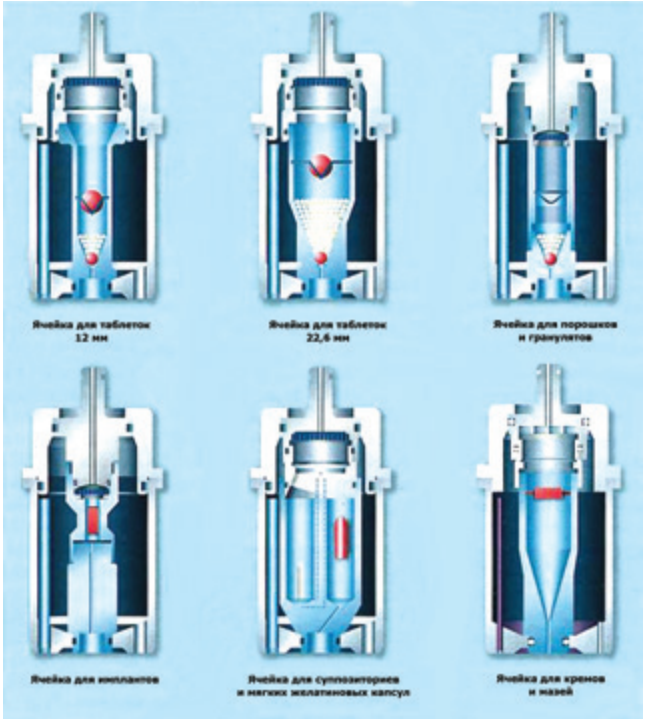


Рисунок 1. Примеры ячеек компании Sotax

стоянную скорость потока. Кроме того, материал должен быть инертным, чтобы предотвратить всасывание лекарственного средства. Исследования также показали, что синусоидальный профиль потока с пульсацией 120±10 импульсов/мин является оптимальным, и это стало требованием, закрепленным в фармакопее USP. Использование поршневого насоса позволяет удовлетворить эти требования, чтобы получить точные и надежные данные тестирования.

Деаэрация среды растворения имеет очень важное значение, так как неудалённые пузырьки воздуха, в свою очередь, влияют на разные параметры процесса (таблица 1).

Есть разные методы деаэрации. Некоторые исследователи делают это вручную в соответствии с методом USP, который занимает много времени. Другие работают с представленными на рынке оборудования станциями подготовки среды растворения. Также можно использовать онлайн-дегазаторы, в которых среда протекает через газопроницаемые трубки под вакуумом.

В системах с открытым циклом через ячейки постоянно проходит поток свежей среды растворения, далее элюат автоматически собирается в режиме офлайн в коллектор фракций, а пробы затем анализируют в спектрофотометре или с помощью ВЭЖХ. Результатом анализа становится дифференциальная кривая высвобождения (рисунок 2), которая также может быть преобразована в кумулятивную кривую.

Таблица 1.

Влияние неудаленных пузырьков воздуха на процессы

Причина	Результат
Нестабильность потока растворителя	Высокая вариабельность результатов
Воздушные пузырьки проникают в ячейку на большой скорости и могут разрушать лекарственную форму	Ускоренное высвобождение активного компонента
Пузырьки воздуха прилипают к лекарственной форме	Замедленное высвобождение лекарственной формы
Пузырьки воздуха прилипают к фрагментам растворенной лекарственной формы и затем прилипают к фильтру	Замедленное высвобождение лекарственной формы

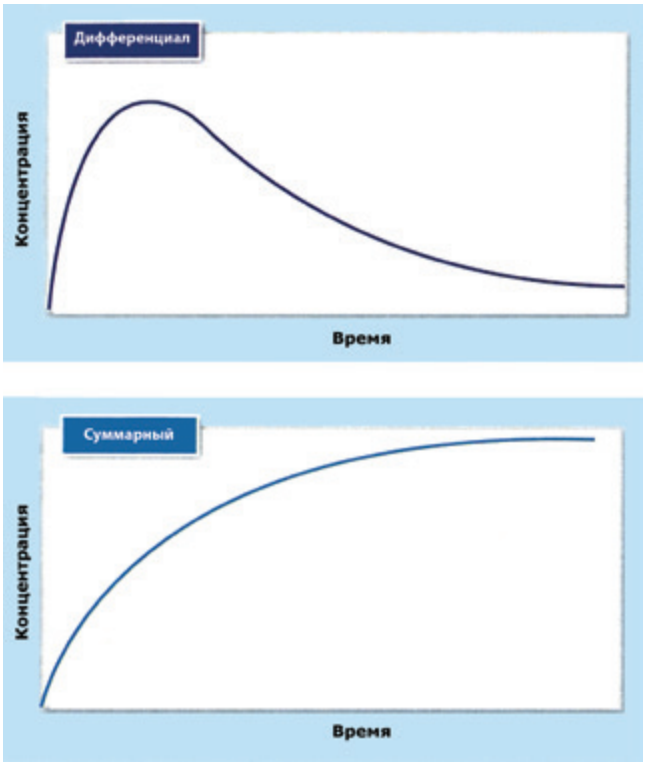


Рисунок 2. **Дифференциальная (вверху) и кумулятивная (внизу) кривые растворения**

которой свежую среду прокачивают через ячейку и собирают фракции (рисунок 3). Эта установка гарантирует, что тест «Растворение» выполняется всегда с условиями достаточного разбавления. Если проводить сбор всей среды «Растворение», прошедшей через ячейку, то при типичном расходе среды в таких системах 16 мл/мин, за 30 мин объем пробы составит 480 мл, что не очень удобно для лаборатории и для анализа. Поэтому устанавливается сплиттер, который позволяет отбирать только определенный объем элюата в пробирки по времени (рисунок 4). Обычно только 10% элюата собирается для анализа, и мы получаем 48 мл пробы.

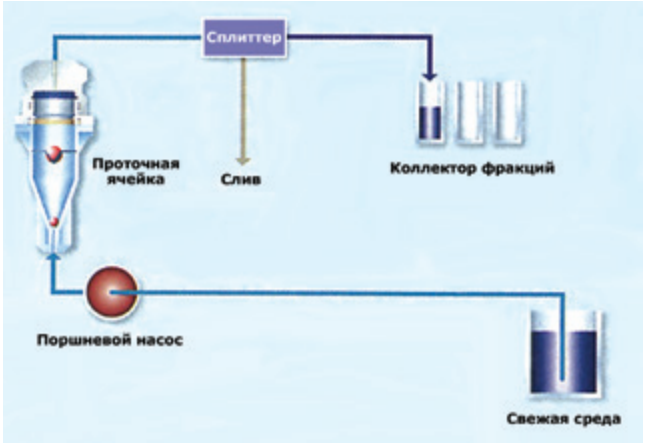


Рисунок 3. **Конфигурация системы открытого цикла**

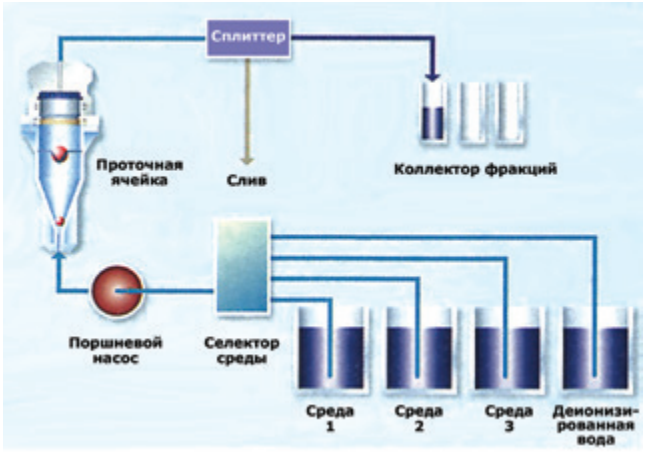


Рисунок 4. **Конфигурация системы открытого цикла с возможностью смены pH и выбора среды растворения**

ОТКРЫТЫЙ ИЛИ ЗАКРЫТЫЙ ЦИКЛ

Системы для растворения в проточной ячейке могут настраиваться на два цикла: открытый или закрытый. Открытая система имеет конфигурацию, в

Кроме того, легко выполняется смена pH среды растворения. Для этого используется селектор среды, чтобы переключать одновременно на семи каналах клапан от одной среды к другой.

Системы с открытой конфигурацией рекомендуется использовать для плохо растворимых лекарст-

венных препаратов или если требуется выполнять изменение pH среды растворения. Кроме того, при тестировании препаратов с быстрым высвобождением, используя метод USP 4, можно более четко отследить поведение лекарственной формы на начальном этапе растворения в отличие от методов USP 1 и 2.

Закрытая система (рисунок 5) представляет собой конфигурацию, в которой среда растворения прокачивается по кругу и не заменяется свежей средой. Элюат собирают в колбу и перемешивают магнитной мешалкой. Образцы отбирают из колбы для дальнейшего анализа или тестируют в онлайн-режиме на спектрофотометре, отражая концентрацию высвободившегося препарата.

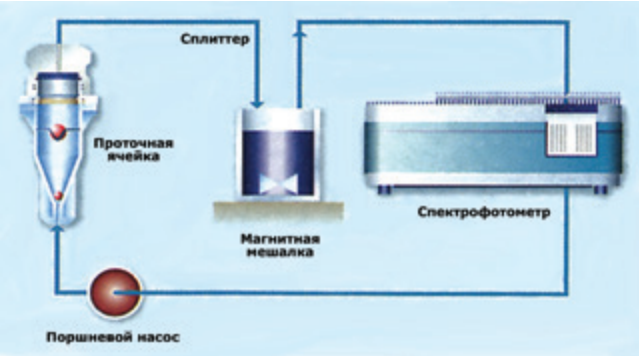


Рисунок 5. Конфигурация системы закрытого цикла со спектрофотометром

Закрытая система имеет конфигурацию, подобную методу с лопастной мешалкой, и имеет ограниченный объем среды растворения. Высвободившийся препарат накапливается в течение долгого времени. Эта конфигурация используется для лекарственных продуктов с очень низкой дозировкой и, по существу, может выполнять растворение в очень малых объемах среды. Типичные области применения включают в себя пример тестирования имплантов.

Вопрос корреляции результатов *in vivo* и *in vitro* до сих пор широко обсуждается, и общее мнение пока не сформировано. Тем не менее метод с применением проточной ячейки с постоянной подачей свежей среды в большинстве случаев гораздо более правдоподобно моделирует процесс пищеварения, чем метод с лопастной мешалкой и фиксированным объемом растворителя. Кроме того, изменения pH позволяет воссоздать условия растворения, соответствующие желудочно-кишечному тракту.

Методика проведения анализа в проточной ячейке также позволяет менять тип потока среды растворения. Поток растворителя может быть ламинарным и турбулентным (рисунок 6). Ламинарный поток характеризуется параллельным движением частиц жидкости и растворенной фазы. Турбулентный поток представляет собой хаотическое движение частиц жидкости во всех направлениях в пределах направления потока. Ламинарный поток наиболее часто используется, однако турбулентный поток является предпочтительным для тестирования имплантов или продуктов, которые требуют перемешивания.

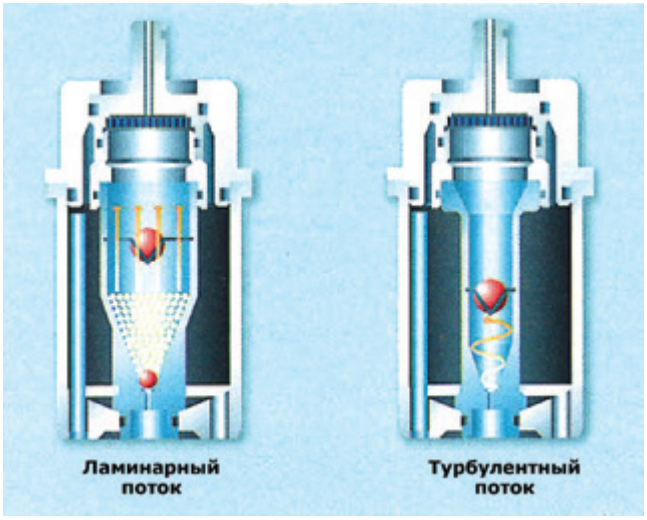


Рисунок 6. Пример ламинарного и турбулентного потоков движения жидкости в ячейке

Для достижения ламинарного потока в проточную ячейку помещаются стандартизированные стеклянные шарики диаметром 1 мм. Среда прокачивается через образец и имеет ламинарный поток. В зависимости от лекарственной формы и типа ячейки есть небольшие изменения в условиях проведения испытаний. Некоторые примеры приведены в таблице 2.

Испытания по растворению полутвердых лекарственных форм часто утомительны. А реализация метода влияет на его эффективность и важна для оценки скорости доставки через кожу. Ячейка Франца широко используется для данного вида исследований из-за отсутствия альтернативы, но не подходит для повседневного использования и автоматического отбора проб.

В качестве альтернативы приборы для проведения анализа по методу USP 4, представляя собой сложный комплекс инструментов, позволяют проводить анализ различных лекарственных форм с хорошей воспроизводимостью результатов. Например, новый дизайн ячейки был недавно разработан для эффективного проведения тестирования мазей и кремов (рисунок 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компания Sotax занимается производством приборов для тестирования лекарственных форм по методу USP 4 с середины 1970-х годов и является первопроходцем в данной области, каждый год патентуя новые формы ячеек для различных лекарственных форм. Сегодня в линейке компании доступно много удобных конфигураций и аксессуаров для проведения анализов по данному методу. Все системы Sotax позволяют проводить их усовершенствование, от самого простого прибора до полуавтоматической рабочей станции. Программное обеспечение WinSOTAX способно управлять процессом растворения и имеет расчетные инструменты, помогающие вычислить процент растворенного вещества и просмотреть профили растворения.

Таблица 2.

Проведение испытаний

Тип ячейки	Изменения в условиях испытаний и рекомендации
Ячейки для таблеток 12 мм и 22,6 мм	• Тестирование таблеток со специальным держателем и без него. В последнее время использование держателя менее распространено. • Тестирование таблеток без стеклянных шариков.
Ячейки для порошков и гранулятов	Гомогенизировать порошок с помощью стандартизованных стеклянных шариков, лактозы и крахмала и добавить 0,01% полисорбата-20 (Tween 20) в среду растворения для предотвращения образования полостей в порошке из-за низкой смачиваемости. Это позволяет снизить разброс результатов.
Ячейка для имплантов	• Если тест длительный со скоростью потока только несколько мл/день, то стоит использовать перистальтический насос с низким расходом или поршневой насос со специальным таймером. • Повысить температуру среды растворения для ускорения процесса. Провести сравнительный тест при 37 °C для корреляции результатов.
Ячейка для суппозиториев и желатиновых капсул	Важно использовать обезжиренные ячейки и промывать их горячей деионизированной водой для предотвращения засорения каналов.
Ячейки для кремов и мазей	Тестирование проводится с использованием оригинальной ячейки Sotax при температуре внутри 32 °C (рисунок 8).

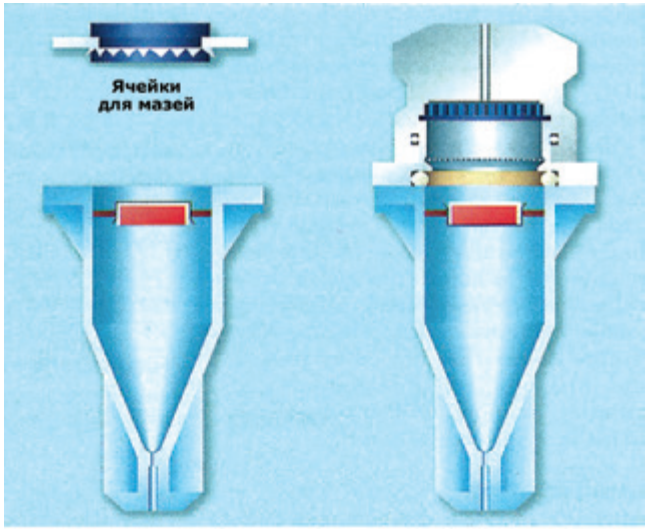


Рисунок 7. **Ячейка для тестирования кремов и мазей**

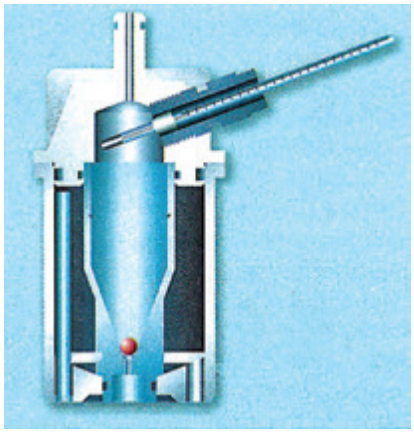


Рисунок 8. **Головка для установки термометра для контроля температуры**

sotax
Solutions for Pharmaceutical Testing

ШЛАНГИ TUDERTECHNICA® НА СТРАЖЕ БЕЗОПАСНОСТИ ФАРМПРОИЗВОДСТВА

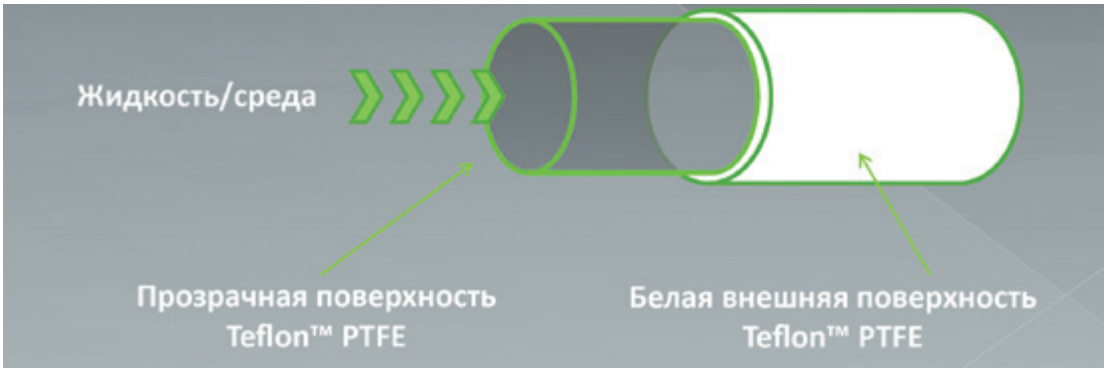
Материал предоставлен компанией TUDERTECHNICA

АННОТАЦИЯ

TUDERTECHNICA – итальянская компания, которая с 1983 года разрабатывает и производит особые высокотехнические трубы, рукава и шланги для пищевой, химической, фармацевтической, косметической промышленности и иных отраслей, где требуются трубы и шланги с высокими эксплуатационными качествами. Вся продукция имеет сертификат качества UNI EN ISO 9001:2008 и производится в строгом соответствии с европейскими нормами GMP 2023/2006/EC (GMP), предъявляющими особые требования к качеству материалов, вступающих в контакт с продуктами питания. Продукция TUDERTECHNICA® известна во всем мире: Европе, России, Северной Америке, Юго-Восточной Азии, Южной Америке, Австралии и Новой Зеландии.

ВВЕДЕНИЕ

Фармацевтические компании крайне требовательны и внимательно относятся к новым возможностям по улучшению своих производственных мощностей с учетом обязательного соблюдения установленных норм безопасности и качества выпускаемой продукции. В рамках решения этих задач TUDERTECHNICA® разработала и внедрила новую линию шлангов под брендом Teflon™: **TUFLUOR™ PTFE**. В основе данной разработки напорно-всасывающий рукав Teflon™ PTFE от компании Chemours (ранее известной как DuPont), с которой TUDERTECHNICA® заключила соглашение о праве на использование материала Teflon™ PTFE в качестве исходного сырья для создания экструдированных шлангов из полимерных рукавов. Таким образом, шланги TUFLUOR™ PTFE производятся из лучших материалов, доступных сегодня на рынке.



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Шланги TUFLUOR™ PTFE – идеальное решение для химической и фармацевтической промышленности, которое позволяет свести к минимуму потенциальный риск контаминации транспортируемых веществ.

Преимущества TUFLUOR™:

- Самое лучшее качество сырья.
- Максимальная безопасность.
- Обработка множества различных продуктов.
- Высокая гибкость рукава.
- Соответствие стандартам фармацевтического и пищевого производства.

МОДЕЛЬНЫЙ РЯД TUFLUOR™ PTFE

Среди шлангов под брендом TUFLUOR™ PTFE лидирующие позиции занимают TUFLUOR™ PTFE CHEM и TUFLUOR™ PTFE PHARM, разработанные специально для химических и фармацевтических производств с учетом особенностей применяемых на этих предприятиях технологий производства и стандартов к качества выпускаемой продукции.

Эти шланги произведены по уникальной технологии с коэкструзионным прозрачно-белым внутренним слоем Teflon™ PTFE (прозрачная поверхность контактирует с транспортируемым веществом и не окрашивается, а белая поверхность является внешней).

Отличительные особенности внутреннего слоя PTFE Teflon™:

1. Внутренняя поверхность более гладкая и с меньшим количеством микропористости по сравнению с общей подкладкой фторполимерного слоя рукава.
2. Повышенный уровень сопротивления проницаемости.
3. Самая низкая вероятность выщелачивания.
4. Минимальный риск перемещения поступающих веществ.

Внутренний прозрачный слой Teflon PTFE обеспечивает максимально высокий уровень чистоты поставляемой жидкости.

Тефлоновая стенка Teflon™ PTFE обладает идеальной толщиной. Несмотря на коэкструзию, она не толще, чем обычный пигментированный внутренний слой. TUFLUOR™ PTFE CHEM и TUFLUOR™ PTFE PHARM обладают превосходной гибкостью.

Внутренний слой TEFLON™ TUFLUOR™ PTFE протестирован и сертифицирован независимыми лабораториями, которые подтвердили его соответствие следующим международным стандартам в области фармацевтики:

- класс II санитарной безопасности (3A)
- USP XXXVI класс VI
- ISO 10993 разделы 5,10,11 (2009)

Рисунок 1. Шланги Teflon™ PTFE с электропроводной тефлоновой поверхностью черного цвета (соответствуют нормам FDA)

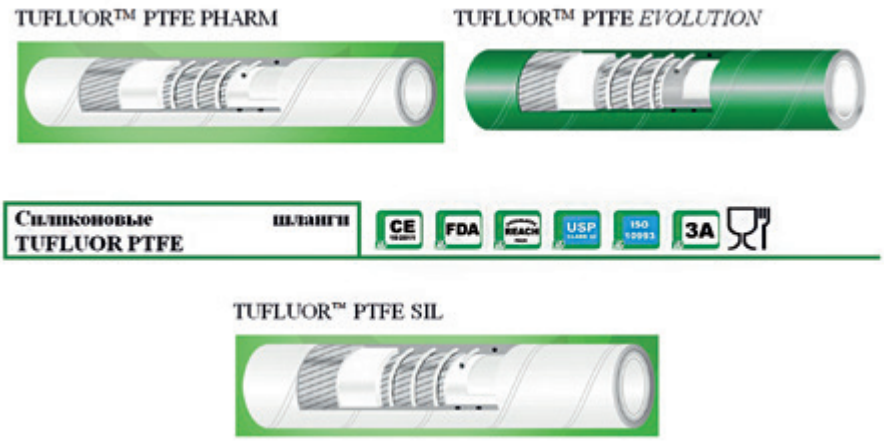


Рисунок 2. Силиконовые шланги Teflon™ PTFE с электропроводной тефлоновой поверхностью черного цвета (соответствуют нормам FDA)

НОВОЕ ПРОДВИНУТОЕ ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ OPENLAB CDS ДЛЯ СБОРА И ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ХРОМАТОГРАФИИ

Материал предоставлен компанией Agilent Technologies

Agilent Technologies

ВВЕДЕНИЕ

Требования к обеспечению целостности данных постоянно претерпевают изменения, что обуславливает необходимость прикладывать все больше усилий для обеспечения успешной работы лабораторий по контролю качества фармацевтических продуктов, а также для получения, анализа и обмена данными . Учитывая такую потребность компаний, Agilent Technologies создали следующее поколение системы сбора и обработки данных – OpenLAB CDS.

OpenLAB CDS – усовершенствованное ПО, обеспечивающее соответствие всем требованиям, предъявляемым к сбору и обработке данных в процессе хроматографии и масс-спектрометрии в сетевом и автономном режимах. Новое ПО Agilent Technologies позволяет максимально контролировать работу приборов, одновременно повышая эффективность и производительность. Единый пользовательский интерфейс обеспечивает доступ к наиболее часто используемым функциям для ЖХ, ГХ и одноквадрупольным системам ЖХ и позволяет управлять ими. Его универсальность помогает повышать производительность, исключая необходимость навыка работы с несколькими программными продуктами. Более того, OpenLAB CDS обладает набором технических средств обеспечения безопасности и целостности данных, что позволяет свести к минимуму контроль процедур и предотвратить удаление или ручное изменение данных. Избежать последних манипуляций удается благодаря возможности назначения права доступа на основе должностных обязанностей пользователя и необходимых ему данных.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

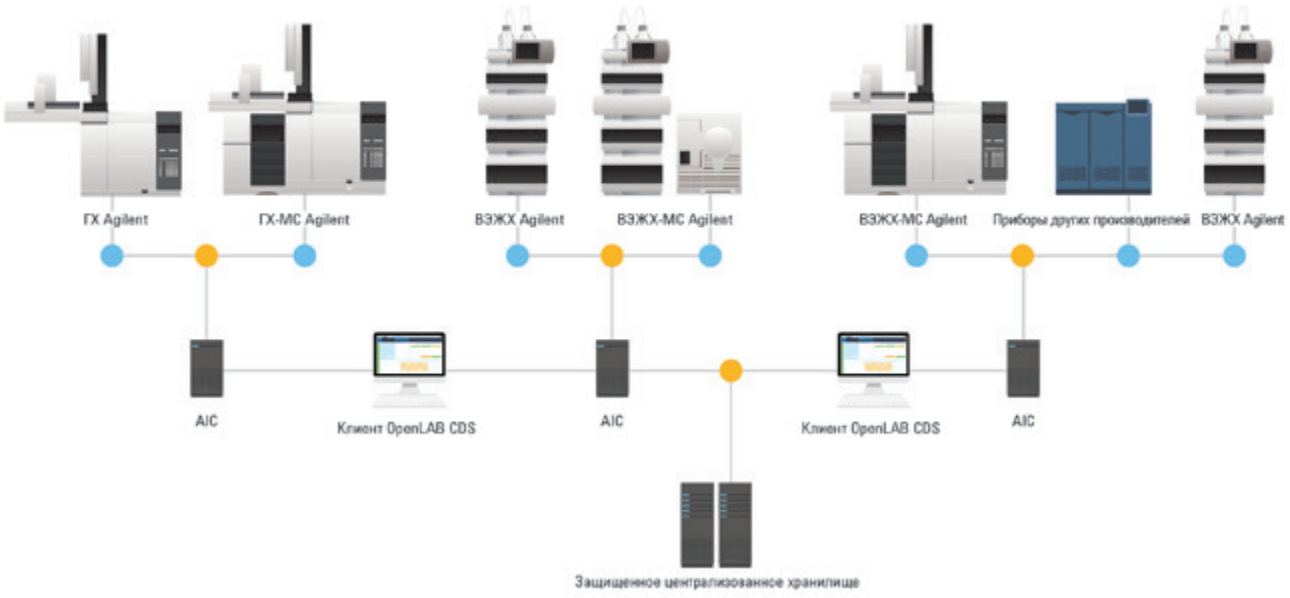
Согласно требованиям, проверки отчетности должны включать и проверки протокола ревизии. В системах сбора и обработки данных других производителей используется комбинированный метод отчетности, при котором в ходе проверок необходимо распечатывать данные протокола ревизии и подписывать вручную. В ПО OpenLAB CDS имеется функция электронной записи подтверждений и проверки протокола ревизии, что существенно упрощает процесс проверки.

Мнение ученых: «В условиях повышения требований к лабораториям, когда в штат приходят новые сотрудники, намного удобнее иметь программное обеспечение с понятным интерфейсом, ведь любой может начать работу почти моментально. Это так просто».

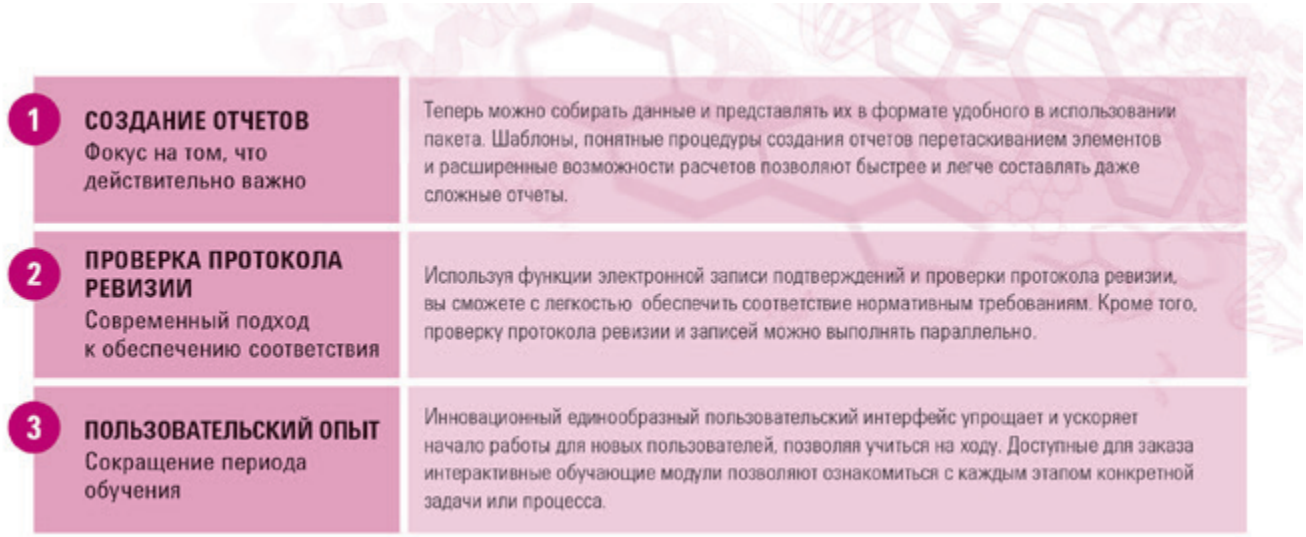
ПРЕИМУЩЕСТВА СИСТЕМЫ OPENLAB CDS

Программное обеспечение ориентировано на простоту использования и имеет пользовательский интерфейс, соответствующий современным стандартам и включающий только действительно нужные элементы управления. Знакомая структура интерфейса и доступность дополнительных образовательных инструментов для оператора обеспечат быстрое начало работы и уменьшат затраты на обучение. Конфигурация «клиент – сервер» обеспечивает максимальную эффективность и непрерывную работу оборудования за счет централизации управления оборудованием и системного администрирования, повышая производительность и улучшая процесс взаимодействия подразделений фармпредприятия путем обмена данными и методами. ПО OpenLAB CDS упрощает процесс ручной интеграции: запатентованная технология для интеграции вручную предоставляет наиболее полезные функции выполнения хроматографии в любой момент, устраняя необходимость работы наугад и сокращая временные затраты.

Во время рутинной работы может возникнуть потребность более подробного анализа каких-либо данных, требующего внимательного изучения нескольких хроматограмм одновременно. Обширные встроенные возможности расчетов обеспечивают получение результатов непосредственно во время анализа данных без необходимости создания полного отчета. Система OpenLAB CDS сохраняет ключевые данные на случай, если оператору понадобится отчет, благодаря чему минимизируется риск ошибок при экспорте данных или ведении записей вручную. ПО OpenLAB CDS позволяет быстро фиксировать искажения, например отсутствующие или дополнительные пики, сдвиги времени удерживания или проблемы с интегрированием. Инструмент визуализации Peak Explorer, к примеру, позволяет более быстро изучать данные за счет упрощения визуализации наложений и искажений. В ПО OpenLAB CDS есть набор предварительно настроенных шаблонов для процесса контроля качества, которые можно с легкостью подогнать под потребности лаборатории. Отчеты можно создавать без необходимости экспорта в другие программы, например в Microsoft Excel. Встроенные функции расчета позво-



Система OpenLAB CDS подстраивается под ваши потребности



Три преимущества системы OpenLAB CDS от Agilent

ляют обрабатывать все ключевые данные непосредственно в системе, исключая ошибки, вызванные экспортом или копированием данных вручную.

Мнение ученых: «Программа подходит как для тех, кому нужны лишь базовые функции, так и для тех, кто использует расширенные функции для сложного анализа».

«Объединение трех программных продуктов в одну систему помогло мне упростить обеспечение поддержки».

ПО OpenLAB позволяет получать данные, анализировать и делиться ими, обеспечивая коммерческую ценность.

Основные системы работы с информацией, которые предоставляет оператору возможность решать следующие задачи.

Система сбора и обработки данных chromatography data system

- Управление приборами компании Agilent и других производителей.
- Быстрая обработка данных и составление отчетов.
- Отслеживание работы приборов с помощью наглядной визуализации.
- Упрощение лабораторных и ИТ-процессов системы организации информации.

Система организации информации

- Доступ к данным в любое время и в любом месте.
- Безопасное хранение данных от начала эксперимента и до конца.
- Обеспечение соответствия нормативным требованиям и защита интеллектуальной собственности.
- Сокращение объема бумажной работы.

Электронный лабораторный журнал

- Запись лабораторных результатов нескольких аналитических систем.
- Быстрый поиск и извлечение данных с помощью современной системы управления запросами.
- Упрощение процедуры совместного написания работ и сотрудничества.
- Защита интеллектуальной собственности и обеспечение прослеживаемости процессов.

КОМПАКТНЫЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСЕЙ И ОЧИСТКИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ВЫСОКИМ ВЫХОДОМ И СТЕПЕНЬЮ ЧИСТОТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ФАРМАЦЕВТИКЕ

Материал предоставлен компанией BÜCHI

АННОТАЦИЯ

Новые системы BUCHI Reveleris® обеспечивают быструю и простую очистку, позволяют отделять компоненты и примеси, остававшиеся ранее невидимыми благодаря передовой технологии обнаружения и обработки сигналов. Компактные и высокоэффективные системы BUCHI идеально подходят для решения широкого спектра задач препаративной хроматографии, отвечая всем современным запросам пользователей.

ВВЕДЕНИЕ

Препаративная хроматография – один из важнейших методов разделения и очистки разнообразных синтетических веществ. Область применения метода широка: от выделения мельчайших количеств ценных продуктов реакции с высокой степенью очистки до получения веществ в промышленных масштабах. В последнем случае важно соблюдать оптимальное соотношение между выходом продукта реакции в ходе фракционирования и расходом растворителя. В зависимости от решаемых задач в производственной или лабораторной практике могут применяться различные типы хроматографии: флэш-хроматография, хроматография среднего давления (колоночная хроматография) или препаративная ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография).

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ПРИМЕР ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТИВНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ФАРМАЦЕВТИКЕ

Любая аминокислота (за исключением глицина) существует в виде двух оптических форм – стереоизомеров L и D. Как известно, человеческий организм способен усваивать только L-аминокислоты, именно поэтому методы разделения стереоизомеров, например с целью получения оптически чистой L-формы, играют важную роль при создании биологически активных фармацевтических препаратов.

Получение оптически чистых синтетических аминокислот – сложная и актуальная задача, которая может быть решена различными методами. Препаративная хроматография позволяет решать ее достаточно эффективно. Основная проблема заключается в том, что аминокислоты в рацемической смеси обладают практически идентичными свойствами, различия только в пространственном расположении заместителей у хирального атома, поэтому если наполнить хроматографическую колонку хиральным сорбентом, то взаимодействие L- и R-формы с наполнителем будет происходить по-разному, а значит, скорость прохождения энантиомеров через колонку будет различной. Однако, нужно понимать, что хиральные сорбенты довольно дороги и их применение в препаративной хроматографии (в отличие от ВЭЖХ) не всегда оправдано. Поэтому химики часто применяют еще один метод разделения рацемических смесей – превращая исходные аминокислоты в диастереомеры, т.е молекулы с двумя оптическими центрами. Разделение смесей диастереомеров можно проводить на обычных сорбентах: силикагеле или оксиде алюминия. Поскольку свойства диастереомеров в значительной степени отличаются друг от друга, то можно подобрать такую смесь растворителей, которая позволит их разделить. Проводимые модификации аминокислот химически обратимы, и после разделения диастереомеров аминокислоты возвращают обратно в исходную L- или R-форму, но уже в оптически чистом виде.

РЕШЕНИЯ ДЛЯ ПРЕПАРАТИВНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ BUCHI

В линейке оборудования для препаративной хроматографии BUCHI предлагаются разнообразные решения, начиная от индивидуальных приборов и заканчивая многофункциональными модульными системами. Новая линейка приборов Reveleris® (рисунок 1), логично вписывается в существующий модельный ряд BUCHI, и состоит из инновационной и эффективной системы для флэш-хроматографии Reveleris® X2 и компактной системы Reveleris® PREP, работающей в двух режимах: высокопроизводительной флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. Оба прибора имеют встроенный детектор по светорассеянию (ELSD) и запатентованную технологию детектирования RevealX™, которая синхронизирует сигналы четырех детекторов (3 сигнала детекторов УФ и ELSD), что гарантирует наилучшую идентификацию искомых веществ в процессе разделения и очистки смесей. Кроме того, доступна версия прибора Reveleris® X2 без ELSD-детектора.

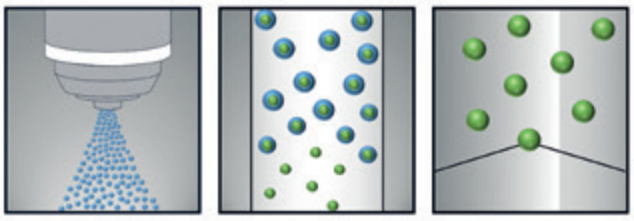
Рисунок 1. Компактные приборы Reveleris® PREP и Reveleris® X2 идеально подходят для любых задач, решаемых препаративной хроматографией

НИ ОДИН КОМПОНЕНТ РАЗДЕЛЯЕМОЙ СМЕСИ НЕ БУДЕТ ПРОПУЩЕН

В препаративной хроматографии для контроля разделяемых веществ наиболее часто применяют УФ-детекторы, однако многие соединения не обладают хромофорными группами и могут быть потеряны в ходе разделения. Кроме того, применяемый растворитель может быть хромофором, а значит, будет создавать помехи для УФ-детектора, снижая его чувствительность в диапазоне коротких волн и затрудняя выявление веществ, излучающих в этом диапазоне.

В таких ситуациях испарительный детектор светорассеяния (ELSD) идеально дополняет детектор ультрафиолетового и видимого диапазонов (UV/VIS) и гарантирует точное обнаружение всех компонентов смеси, даже если они не содержат хромофорные группы. После прохождения через колонку, небольшая часть потока элюента отводится и распыляется на мелкие капли небулайзером. В отличие от классического ELSD-детектора в системе Reveleris® достаточно скорости потока элюента 30 мкл/мин и не требуется дополнительного растворителя или дорогостоящего

инертного газа. Последующее упаривание подвижной фазы позволяет получить твердые мелкодисперсные частицы аналита, через которые пропускают лазер. Полученный в результате рассеяния свет детектируется фоточувствительными элементами, которые реагируют только тогда, когда в потоке газа присутствуют твердые частицы. Таким образом, ELSD-детектор позволяет обнаруживать множество веществ, невидимых в УФ-диапазоне, и определять все компоненты, которые менее летучи, чем используемая подвижная фаза (рисунок 2).



Рисунки 2. Распыление, упаривание и детектирование

Эффективность такой комбинированной системы детектирования может быть продемонстрирована на примере очистки пептидов. На рисунке 3 показана хроматограмма двух УФ-сигналов (синие и фиолетовые линии) и сигнала ELSD (зеленая линия), зарегистрированных с помощью Reveleris® X2 в процессе флэш-хроматографии. Очевидно, что таурин не может быть обнаружен УФ-детектором и идентифицируется только с помощью встроенного ELSD-детектора. Благодаря комбинации различных сигналов появляется возможность обнаружить непрореагировавшие фракции аминокислоты и отделить их от других компонентов смеси.

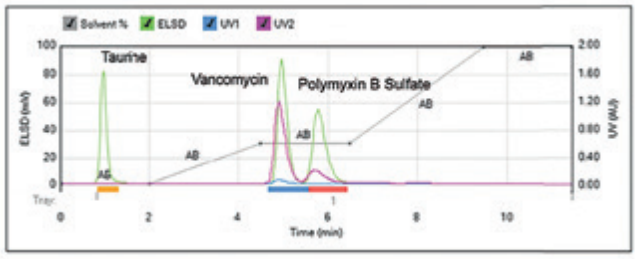


Рисунок 3. Очистка и рекуперация пептидов при использовании Reveleris® X2: таурин может быть обнаружен и отделен только благодаря встроенному ELSD-детектору

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ БЕЗ ЛИШНИХ СЛОЖНОСТЕЙ

Продукты линейки Reveleris® отвечают современным требованиям химиков и специалистов в области хроматографии, и полностью соответствуют высоким стандартам, предъявляемым к флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ. Системы Reveleris® обеспечивают высокую степень чистоты целевых соединений с максимально возможным выходом. Благодаря передовой технологии RevealX, позволяющей объединить и синхронизировать до четырех сигналов детектора (в том числе ELSD), а также системе эффективного сбора фракций может быть достигнута максимально возможная степень извлечения целевого вещества. Кроме того, приборы серии Reveleris® оснащены мощным и интуитивно понятным программным обеспечением, все возможности которого реализованы в панели управления с 12-дюймовом сенсорным экраном, на котором отображаются все необходимые настройки процесса, обеспечивающие пользователю максимальное удобство эксплуатации.

Простое и понятное программное обеспечение позволяет менять рабочие параметры процесса и редактировать градиент в режиме реального времени. Переключение между флэш-хроматографией и препаративной ВЭЖХ осуществляется одним касанием сенсорного экрана так же просто, как и переключение между режимами нормальной фазы и обращенной фазы. Кроме того, приборы Reveleris® обладают функцией автоматического распознавания штативов и картриджей благодаря наличию меток RFID. На основе полученной информации настраиваются оптимальные параметры процесса для работы с картриджами Reveleris®.

Новая линейка компактных приборов BUCHI Reveleris® предлагает максимальное удобство использования и гибкость применения, гарантируя наивысшую степень чистоты в совокупности с максимальным выходом целевого продукта, а также очистку разнообразных исходных веществ, и все это в сочетании с традиционным швейцарским качеством BUCHI.

РегЛек 2016

ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

«СИСТЕМА РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ: ИССЛЕДОВАНИЯ И ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВО, РАЗРАБОТКИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ»

«РЕГЛЕК 2016»

22 ноября 2016 г., Москва, гостиница «Холидей Инн Москва Лесная»

В ПРОГРАММЕ КОНФЕРЕНЦИИ

- Регистрационное досье: действующая структура и перспективы совершенствования
- Требования к оформлению документов по системе фармаконадзора при регистрации, подтверждении регистрации и обращении лекарственных препаратов
- Экспертиза данных польза/риск (эффективности и безопасности)
- Фармацевтическая экспертиза
- Лабораторная экспертиза
- Фармакопейная секция
- Новые группы лекарственных средств и биомедицинские клеточные продукты: требования к их экспертизе
- Экспертиза взаимозаменяемости лекарственных средств
- Экспертиза иммунобиологических лекарственных средств
- Экспертиза лекарственных средств как начальный этап комплексной системы обеспечения доступности лекарственных средств

Дополнительная информация на сайте www.fru.ru и по тел.:
(495) 359-06-42, 359-53-38, e-mail: fru@fru.ru, skype: fru2012

Обращаем Ваше внимание, что Оргкомитет конференции оставляет за собой право вносить изменения в программу и состав докладчиков

АУДИТ НА СООТВЕТСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ GxP И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ ПО УСТРАНЕНИЮ ОТКЛОНЕНИЙ

Зденек Павелек

Обеспечение качества, безопасности и эффективности лекарственных средств – задача, которая стоит перед каждым фармацевтическим производителем. С этой целью во всей мировой фарминдустрии разработан и внедрен ряд правил, которые называются требованиями надлежащих практик, или GxP, и выполнение которых фармацевтическими производителями контролируется со стороны государственных органов. Россия не является исключением. По информации директора ФБУ «ГИЛС и НП» Владислава Шестакова, по состоянию на конец сентября Минпромторг России получил 440 заявлений на выдачу заключений о соответствии производителей лекарственных средств для медицинского применения на соответствие требованиям правил надлежащей производственной практики, утвержденных приказом Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015). Из поданных заявлений в ФБУ «ГИЛС и НП» поступило 336. По словам В. Шестакова, уже проведено 87 проверок, а к концу года их количество достигнет 180. Мы попросили рассказать о своих возможностях в отношении решения задач для успешного прохождения инспекционных проверок директора департамента качества и обучения FAVEA Group Зденека Павелека.

Расскажите, пожалуйста, о своей экспертной группе, которая работает с фармацевтическими предприятиями, помогая им решить задачи соответствия требуемым государством правилам?

Высококвалифицированные аудиторы FAVEA имеют многолетний опыт работы на ведущих международных фармацевтических предприятиях, таких как IVAX Corporation, TEVA, Pliva Lachema, а также в фармацевтических компаниях стран СНГ и Инспекторате Украины. Все сотрудники прошли специализированное обучение по программе инспектората российских регуляторных органов, осуществляющих инспекционные аудиты с целью выдачи заключений о соответствии производителя лекарственных средств требованиям правил надлежащей производственной практики. Среди сотрудников FAVEA также имеются специалисты с практическим опытом по асептическому производству, по биотехнологическим производствам, в том числе препаратов крови полного цикла и т.д. Данные аспекты позволяют нам проводить максимально полную оценку аудируемого производства с выявлением несоответствий, их классификацией по степени критичности и дальнейшей разработкой (при необходимости) комплекса мероприятий по их устранению.

С какими надлежащими практиками работает компания FAVEA?

Экспертная команда компании FAVEA осуществляет добровольные аудиты фармацевтических предприятий и их контрагентов на соответствие требованиям различных надлежащих практик GxP:

- GMP – надлежащая производственная практика.
- GDP – надлежащая дистрибьюторская практика.
- GLP – надлежащая лабораторная практика.
- GSP – надлежащая практика хранения.

В настоящее время актуальным является вопрос проведения прединспекционных GMP-аудитов как собственных фармацевтических производств, так и партнеров – производителей АФИ, готовых форм (для работы по контракту), и в первую очередь зарубежных, на соответствие требованиям правил надлежащей производственной практики, утвержденных приказом Минпромторга России от 14.06.2013 № 916.

Но, кроме проведения аудитов, мы готовы предложить и консультационные услуги по внедрению надлежащих практик в компаниях заказчика.

Что именно Вы можете предложить фармацевтическим производствам с точки зрения надлежащей производственной практики?

В первую очередь, привлекая специалистов компании FAVEA, заказчик получает объективную, реальную картину состояния производства, с одной стороны, с точки зрения GMP, максимально приближенную к тому, как ее видят государственные инспекторы, а с другой – и техническую/технологическую оценку производства с целью выявления различных несоответствий и «узких» мест.

Проведение аудита и оценка производства помогают выявить имеющиеся проблемы. А что дальше? Помогает ли FAVEA в решении выявленных несоответствий?

Немаловажно, что заказчик получает всестороннюю техническую поддержку и консультирование специалистами FAVEA на всем протяжении подготовки к государственной инспекции, включая разработку плана корректирующих и предупреждающих действий (CAPA), оценку их достаточности и эффективности, предложения по реализации мероприятий с рекомендациями о возможных практических решениях. При желании фармацевтические предприятия могут получить от FAVEA дальнейшую помощь при прохождении инспекции со стороны регуляторных органов, которая включает в себя подготовку документов с целью подачи заявления на получение заключения о соответствии правилам надлежащей производственной практики, представительство интересов заказчика в Минпромторге России и т.д.

Чем вы отличаетесь от других компаний, предлагающих услуги для фармацевтического рынка России и стран Таможенного союза ЕАЭС?

Дополнительным преимуществом специалистов FAVEA является большой практический опыт проведения аудитов в качестве «принимающей» стороны различными инспекционными агентствами стран ЕС, а также FDA. Это позволяет нам дать необходимые рекомендации заказчику по принятию аудита, поведению сотрудников во время прохождения инспекции, ведению диалогов с аудиторами и другим вопросам, которые могут возникать у заказчика, принимающего государственный инспекторат.

Проведение прединспекционного GMP-аудита с помощью компании FAVEA существенно увеличивает шансы заказчика на успешное прохождение государственной инспекции и получение положительного заключения.

Какие еще вопросы надлежащих практик в настоящий момент актуальны для фармацевтического бизнеса?

Другим важным вопросом в настоящий момент является гармонизация требований стран Таможенного союза к отдельным областям фармацевтической отрасли, в том числе к надлежащей дистрибьюторской практике (GDP), и их утверждение как обязательных правил. В связи с этим компания FAVEA предлагает услуги по аудиту российских и зарубежных поставщиков АФИ, вспомогательных и упаковочных материалов и дистрибьюторов готовых лекарственных средств на соответствие требованиям GDP. В рамках данного направления работы мы готовы предложить заказчикам различные варианты сотрудничества, в том числе с целью оптимизации процедуры аудитов поставщиков/дистрибьюторов (географическая составляющая, финансовая и т.д.)

favea

Биографическая справка

Зденек Павелек, директор департамента качества и обучения FAVEA Group

Зденек Павелек окончил Масариков университет в г. Брно (Чехия), факультет естественных наук. До прихода в компанию FAVEA Зденек работал директором отдела управления качеством в компании «TEVA Czech Industries» и организовывал систему качества всех подразделений «TEVA Worldwide». Его главной задачей была подготовка системы качества для FDA-инспекций, которые были успешно пройдены в 2010, 2011 и 2014 гг. Также ранее он занимал должность начальника отдела контроля качества в компании «Galena».

За время своей работы Зденек Павелек разработал ряд авторских учебных курсов и лекций для обучения специалистов фармацевтических фирм Чехии и других европейских стран (Словакии, Польши, Латвии, Литвы, Германии, Швейцарии), а также Украины, России, Казахстана, Китая и Бразилии.

В настоящий момент он активно участвует в подготовке фармацевтических производителей лекарственных средств к официальным проверкам и аудитам со стороны регуляторных органов Евросоюза и США, занимается вопросами управления качеством проектов FAVEA.

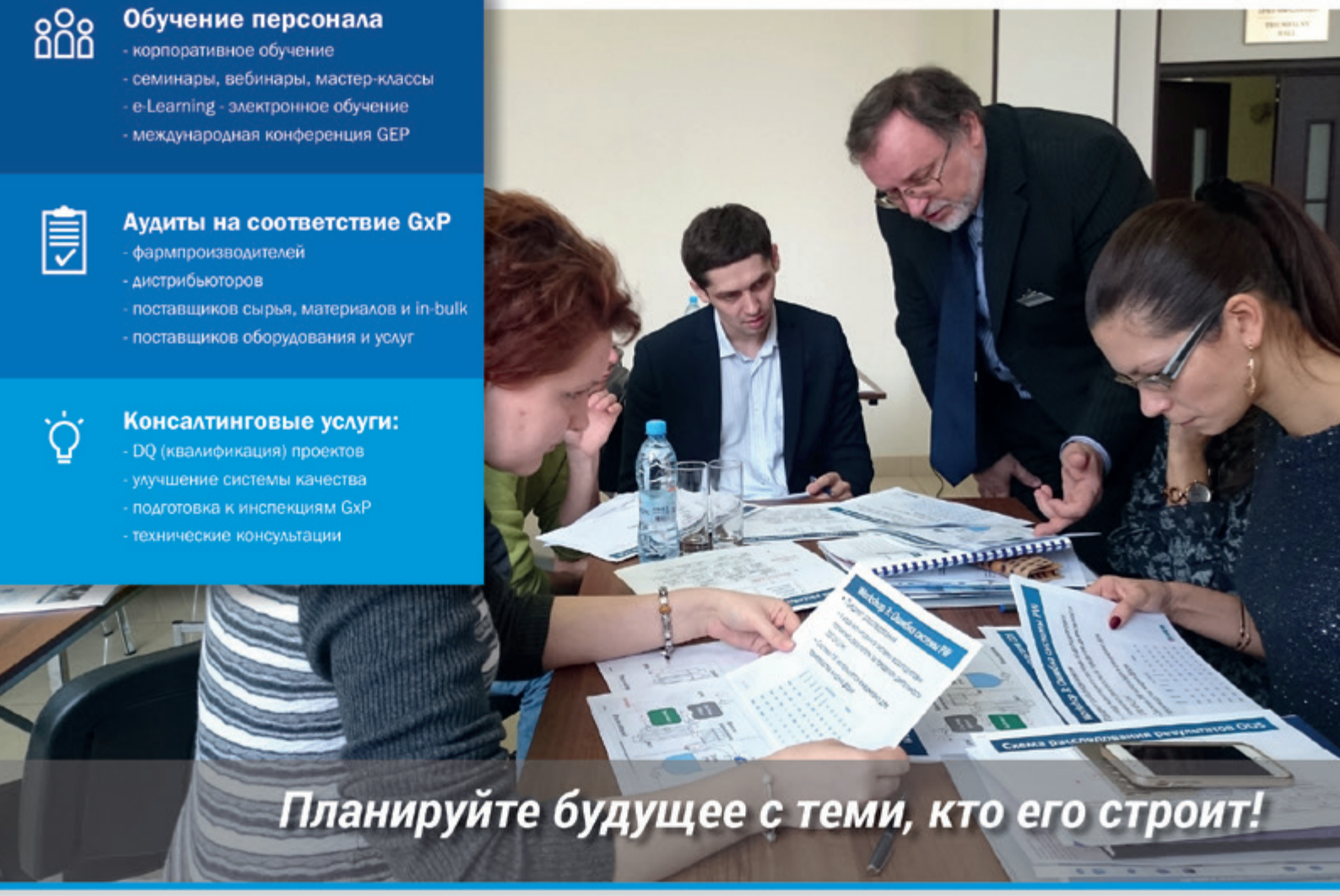
favea

Инжиниринг - Технологии - Инновации

Обучение персонала
- корпоративное обучение
- семинары, вебинары, мастер-классы
- e-Learning - электронное обучение
- международная конференция GEP

Аудиты на соответствие GxP
- фармпроизводителей
- дистрибьюторов
- поставщиков сырья, материалов и in-bulk
- поставщиков оборудования и услуг

Консалтинговые услуги:
- DQ (квалификация) проектов
- улучшение системы качества
- подготовка к инспекциям GxP
- технические консультации



Планируйте будущее с теми, кто его строит!

"В каждом из подразделений компании FAVEA работают специалисты высочайшего уровня"

Максим Хамет
Председатель совета директоров
FAVEA Group

"Наши эксперты несут знания, полученные в крупнейших фармацевтических международных корпорациях"

Христос Чанаклис
Генеральный директор
FAVEA Group

"e-Learning - это эффективный, способ системного обучения сотрудников всех категорий на производстве"

Зденек Павелек
Директор по управлению качеством FAVEA Group

Актуальные курсы e-Learning
- ✓ GMP - Общие требования
- ✓ GMP - Производство стерильных лекарственных средств
- ✓ GMP - Валидация и квалификация
- ✓ GEP - Надлежащая инженерная практика
- ✓ GDP - Надлежащая дистрибьюторская практика

Фармацевтические проекты по стандартам GMP

FAVEA - ведущая европейская инжиниринговая компания, занимающаяся проектированием и реализацией фармацевтических производств "под ключ"

Телефон
+7 499 550 68 01

E-mail
info@favea.org

Веб-сайт
www.favea.org

ПАМЯТИ НИКОЛАЯ БОРИСОВИЧА ЛЕОНИДОВА

27.08.1945. – 24.09.2016.

Российская наука понесла тяжёлую утрату – **24 сентября 2016 г.** скоропостижно скончался доктор биологических наук, профессор, член редколлегии нашего журнала **Николай Борисович Леонидов**.

Н.Б. Леонидов родился 27 августа 1945 г. в селе Никольское Безенчукского района Куйбышевской области, но его детство прошло на Колыме. После окончания средней школы Николай поступил на химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, который закончил с отличием. Со студенческих лет Николая Борисовича интересовали проблемы строения вещества, кристаллическая структура и конформации органических соединений. По этой тематике он выполнил дипломную работу в лаборатории ядерного магнитного резонанса МГУ и поступил в аспирантуру Института физической химии АН СССР (1970–1973 г.г.).

Будучи сотрудником Института по биологическим испытаниям химических соединений (г. Купавна, Московская обл.), Николай Борисович начал заниматься исследованием зависимости биологических свойств органических веществ от строения их кристаллической решётки. Именно в этот период он сделал своё главное открытие: обнаружил, что во многих случаях растворы различных полиморфных модификаций одного и того же вещества обладают разными свойствами, в том числе и фармакологическими. Этот результат далеко не сразу был принят научным сообществом. Первое важное применение новых научных подходов в практике произошло в 1986 г. Используя новые знания о структуре веществ, Николай Борисович разработал технологию получения радиопротектора из экстракта облепихи и обеспечил этим препаратом ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС.

Докторскую диссертацию «Новые аспекты теории полиморфизма биологически активных веществ и проблема создания лекарственных средств нового поколения» Николай Борисович успешно защитил в 1997 г. по специальности 14.00.25 «Фармакология». Важно отметить, что одним из его официальных оппонентов был профессор С.Э. Шноль, который горячо поддержал исследования диссертанта.

Николай Борисович проявил себя как незаурядный организатор науки. В сложное для нашей страны время, в 1990-е годы, он добился создания государственного исследовательского института «Биоэффект» Минпромнауки России, задачей которого была разработка новых лекарственных средств, базирующаяся на современных научных представлениях о полиморфизме органических соединений. Примером эффективности применения технологий полиморфного модифицирования является разработка и внедрение в 1993–1994 гг. в практику отечественного здравоохранения и медицинской службы Вооружённых сил РФ полиморфных модификаций известных лекарственных веществ – дикаина и метилурацила в виде превышающих мировой уровень оригинальных патентнозащищенных препаратов местного анестетика Леокаина® и рано- и ожогозаживляющего и противовоспалительного средства Бетамецила® и пяти видов их лекарственных форм. Академик РАМН, заведующий кафедрой глазных болезней РГМУ А.П. Нестеров отмечал, что результаты исследований Николая Леонидова являются уникальным научным открытием, не имеющим мировых аналогов.

В последние годы Николай Борисович был профессором кафедры фармацевтической технологии Рязанского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, где он инициировал и возглавил новое научное направление, связанное с разработкой систем доставки лекарственных веществ на наноносителе – детонационном наноалмазе.

Николай Борисович – автор более 300 научных публикаций, 130 изобретений, книги «Патентный закон России. 1801–2001». Ему присвоено почётное звание «Заслуженный изобретатель Российской Федерации». В 1990 г. получил национальную премию «Техника – колесница прогресса» журнала «Изобретатель и рационализатор». В 1991 г. награжден Золотой медалью Всемирной организации интеллектуальной собственности (Женева, Швейцария), которая впервые в мире была вручена за достижения в области фармацевтики. В 1996 г. за разработку и внедрение в практику Леокаина® Н.Б. награждён Премией Правительства Российской Федерации. Он являлся действительным членом Британской академии фармацевтов, Нью-Йоркской академии наук, Международной фармацевтической федерации, Американской фармацевтической ассоциации, Общества фармацевтических и галеновых технологий, Американской и Британской ассоциаций деятелей фармацевтической науки, Американского и Европейского обществ местной анестезии, был избран действительным членом Российской Академии медико-технических наук. Работал федеральным экспертом научно-технической сферы Минобрнауки России.

Николай Борисович был светлым, незаурядной доброты человеком. За вклад в духовное возрождение общества Николай Борисович был награжден медалью Святого благоверного князя Даниила Московского.

Имя выдающегося учёного и изобретателя Николая Борисовича Леонидова навсегда останется в истории науки и в памяти его коллег и учеников.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

Международная выставка оборудования, сырья
и технологий для фармацевтического производства

International exhibition of equipment, raw materials
and technologies for pharmaceutical production

pharmtech & ingredients

Организатор
Organised by

ITE

+7 (499) 750-08-28
pharmtech@ite-expo.ru

При поддержке
Supported by

Новости GMP

pharmtech-expo.ru

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

К публикации принимаются законченные оригинальные работы (до 25 машинописных страниц, включая иллюстративный материал и список литературы), рассматривающие экспериментальные исследования в области фармацевтической технологии и разработки, вопросы оценки качества, эффективности, безопасности воспроизведенных и оригинальных лекарственных средств и регистрации лекарственных средств.

Журнал также публикует предлагаемые авторами и одобренные редакционной коллегией обзорные статьи по актуальным проблемам фармацевтической технологии, разработки и регистрации лекарственных средств (до 40 машинописных страниц, включая иллюстративный материал и список литературы).

Работы приоритетного характера (1-3 машинописные страницы), содержащие не более 3 иллюстраций, публикуются в виде коротких сообщений.

Текст статьи должен быть представлен в редакцию на адрес электронной почты: info@pharmjournal.ru, набранным в текстовом редакторе MS Word версии не ниже 2003. Название файла – фамилия первого автора. Редакция не несет ответственности за содержание и достоверность представленного материала.

Первая страница статьи начинается с УДК и названия статьи на русском языке, напечатанного заглавными буквами по центру. Далее следует список авторов на русском языке. Для каждого автора указываются инициалы и фамилия, сначала пишутся инициалы, потом фамилия автора. Инициалы отделяются от фамилии автора одинарным пробелом. Затем следуют точные названия и адреса (с обязательным указанием почтового индекса) всех учреждений (с цифровой пометкой, где работает каждый из авторов), звездочкой в верхнем регистре помечен автор, ответственный за переписку (* – ссылка на телефон и адрес электронной почты). Редакция не несет ответственности за искаженное воспроизведение имен собственных, допущенное по вине автора.

Затем приводится краткое резюме статьи (**Резюме**.) на русском языке (не более 100 слов). Далее следуют ключевые слова (**Ключевые слова**:) (не более 6) на русском языке.

Далее в том же порядке: название статьи заглавными буквами по центру, список авторов с указанием точных названий и адресов с почтовым индексом всех учреждений/организаций (также с цифровой пометкой в верхнем регистре, указывающей, где работает каждый из авторов), краткое резюме (**Abstract**.) и ключевые слова статьи (**Keywords**:) в переводе на английский язык.

Текст экспериментальной статьи и коротких сообщений должен быть разбит на разделы: 1) ВВЕДЕНИЕ; 2) МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ; 3) РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ; 4) ЗАКЛЮЧЕНИЕ; 5) ЛИТЕРАТУРА (все буквы в названиях разделов - заглавные).

Все сокращения и аббревиатуры, использованные в тексте статьи, должны быть расшифрованы (либо при первом употреблении в скобках, либо в конце статьи в списке сокращений). Расшифровка сокращений и аббревиатур иноязычных терминов должна быть представлена на языке оригинала.

Правила набора. Интервал между словами должен быть один пробел, перенос слов не делать, текст набирается шрифтом Times New Roman, 14 кеглем через полтора интервала. Название статьи набирается заглавными буквами полужирным шрифтом, инициалы и фамилии авторов – полужирным шрифтом. При обозначении единиц измерения должна использоваться система единиц СИ. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств. При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов. При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производитель и страну происхождения. При описании специфических импортных реактивов необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива. При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности. При описании используемых стандартных образов приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности. 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.

К статье необходимо приложить список всей цитируемой литературы, оформленный в соответствии с действующим ГОСТ Р 7.0.5-2008. В тексте статьи следует указывать номер ссылки в квадратных скобках цифрами в соответствии с пристатейным списком литературы. Ссылки нумеруются в порядке цитирования. Перед списком указывается ЛИТЕРАТУРА прописными буквами. Список литературы должен представлять собой полную затекстовую ссылку. Для книг и сборников указываются точные названия по титульному листу, место и год издания, страницы; для нормативных документов – тип документа и принявший его орган (постановление Правительства Российской Федерации, приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации и т. п.), дата утверждения, номер и точное название. Для журнальных статей указываются фамилия и инициалы авторов, полное название статьи, название журнала, год, номер выпуска, номера страниц.

Решение о публикации принимает редакция. Редакция журнала оставляет за собой право вносить стилистические изменения, не искажающие смысл. Корректура не высылается.

Образец оформления статей, примеры сокращения единиц измерения и оформления ссылок представлены на сайте журнала: www.pharmjournal.ru.

Подписка на научно-производственный журнал*

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Журнал выходит 1 раз в квартал

АНКЕТА ПОДПИСЧИКА

Фамилия: _____

Имя: _____

Отчество: _____

Предприятие: _____

Должность: _____

Отдел: _____

Необходимое количество экземпляров журнала: _____

Телефон: _____

Факс: _____

E-mail: _____

Почтовый индекс: _____

Город, район, область: _____

Адрес: _____

Пожалуйста, отметьте один или несколько вариантов

Наиболее интересные для Вас разделы: ☐ Новые методики анализа ☐ Регистрационные вопросы	*Какие материалы вы хотели бы видеть в следующих номерах:* ☐ Практические пособия выполнения анализов ☐ Новости фармацевтической отрасли ☐ Пути решения трудностей при регистрации ☐ Аналитические статьи и обзоры ☐ Оборудование для разработки и анализа
Нужно ли размещать тематические рекламные блоки в журнале: ☐ *Да* ☐ *Нет*	*Ваши предложения и пожелания:* _____ _____ _____ _____

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

ВНИМАНИЕ! Почтовая доставка за пределы России, в т.ч. страны ЕАЭС, ЕС, а также Украину, Узбекистан, Туркменистан **платная**.

* Отсканированную копию заполненной анкеты необходимо выслать на электронный адрес редакции: **info@pharmjournal.ru** или на почтовый адрес:
115054, Москва, ул. Дубининская, д. 57, стр. 2, оф. 2.306.
Также Вы можете оформить подписку на нашем сайте в разделе «Подписка»: **www.pharmjournal.ru**

Благодарим Вас за неоценимый вклад в развитие Журнала!