WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК

ISSN2305-2066

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ®

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

pharmtech & ingredients

АНАЛИТИКА ЭКСПО

IPHEB & CPhI russia

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

ФБУ «ГИЛС и НП»

BIACORE T100

АВТОМАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА АНАЛИЗА БИОМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

GE Healthcare



В НОМЕРЕ:

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА: ОБЗОР ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ РАЗРАБОТКИ И НАРАБОТКИ ОПЫТНЫХ ПАРТИЙ ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА ДЛЯ ТЕСТА КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

ПРОЦЕДУРА ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВЫБОРА ПОСТАВЩИКОВ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ГЛФ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АВТОМАТИЗАЦИИ НА ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» НА ПРИМЕРЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «БЕТАСЕРК, ТАБЛЕТКИ 16 МГ»

УСТАНОВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПИСАНИЯ ОБЪЕКТА ГОСУДАРСТВЕННОЙ ЗАКУПКИ «ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ» ДЛЯ ПРЕДОСТАВЛЕНИЯ ПРЕФЕРЕНЦИЙ ЛОКАЛЬНЫМ ПРОИЗВОДИТЕЛЯМ

№ 1 (14) ФЕВРАЛЬ 2016

Summum bonum medicinae sanitas

Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

СОЗДАНИЕ И МОДЕРНИЗАЦИЯ «ПОД КЛЮЧ» ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ, ХИМИЧЕСКИХ, ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ И ЛАБОРАТОРИЙ

ПРОЕКТИРОВАНИЕ



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

СТРОИТЕЛЬСТВО





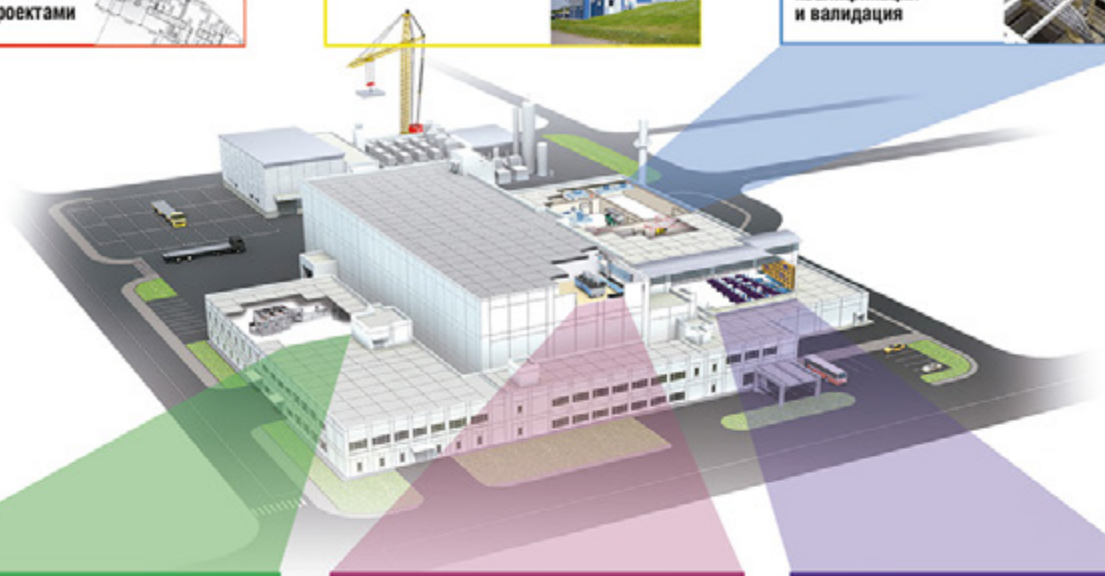
- Модульные здания из легковозводимых конструкций
- Реконструкция объектов
- Прокладка инженерных сетей
- Электромонтажные работы
- Внутренние отделочные работы
- Фасадные работы

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 согласования технического задания (URS)
- Формирование ТКП (технико-коммерческих предложений)
- Разработка детальных спецификаций оборудования и сопровождающей документации
- 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
- Масштабирование процессов: от лабораторного до промышленного

СЕРВИС, ВАЛИДАЦИЯ, ОБУЧЕНИЕ





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

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

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

www.phct-group.com
www.phct.ru

WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

При поддержке ФБУ «ГИЛС и НП»

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

Директор журнала
Залеских О.В.

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.
Леонидов Н.Б., проф., д.биол.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)

Выпускающий редактор:
Дорина Е.А., к.п.н.
info@pharmjournal.ru

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

Редактор-корректор:
Троицкая Е.Н.

Адрес редакции
Россия, 115516, Москва,
ул. Промышленная, д. 11/3, оф. 419
+7 (495) 720 42 20
info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Отпечатано в типографии
«Тверской Печатный Двор»
Россия, 170518, Тверская область,
Калининский район,
с. Никольское, д. 26

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

Ответственность за опубликованные материалы несут авторы

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

Journal director
Zaleskikh O.V.

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
Leonidov N.B., 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)

Commissioning Editor:
Dorina E.A., PhD
info@pharmjournal.ru

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

Corrector:
Troitskaya E.N.

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

Editorial office address
11/3, office 419, Promyshlennaya str.,
115516, Moscow, Russia
+7 (495) 720 42 20
info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Printing office
«Tverskoy Pechatny Dvor»,
26, Nikolskoe village,
Kalininsky district, Tver Region,
170518, Russia

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**

Мероприятия 8 **Events**

Вопросы ценообразования 18 **Questions about Pricing**

Раздел «Фармацевтическая технология и нанотехнологии» **«Pharmaceutical Technology and Nanotechnology» part**

Секция «Современные технологии создания лекарственных форм» ***«Modern Technology of Creating Dosage Forms» section***

Симонян А.В., Саламатов А.А., Симонян М.А., Кожанова А.Н., Марайкина Н.О., Попова Ю.А. 24 *Simonyan A.V., Salamatov A.A., Simonyan M.A., Kozhanova A.N., Maraikina N.O., Popova J.S.*

ТЕХНОЛОГИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ ТАБЛЕТОК КИСЛОТЫ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ

COMBINED ACETYLSALICYLIC ACID TABLETS TECHNOLOGY

Секция «Фармацевтическая разработка» ***«Pharmaceutical Development» section***

Власенко Ю.В. 30 *Vlasenko Yu.V.*

ПРОЕКТНО-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ПРИМЕРЕ ДЖЕНЕРИКОВОГО МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО АМОКСИЦИЛЛИН И КЛАВУЛАНОВУЮ КИСЛОТУ

PROJECT-ORIENTED APPROACH TO FINISHED PHARMA PRODUCT DEVELOPMENT IN THE CONTEXT OF GENERIC POLYCOMPONENT DRUG CONTAINING AMOXYCILLIN AND CLAVULANIC ACID

Демина Н.Б. 38 *Diomina N.B.*

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА: ОБЗОР ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ РАЗРАБОТКИ И НАРАБОТКИ ОПЫТНЫХ ПАРТИЙ ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT: REVIEW OF EQUIPMENT FOR LABORATORY DEVELOPMENT AND PILOT BATCHES PRODUCTION OF SOLID DOSAGE FORMS

Хохлов А.Ф., Бровченко Б.В., Смирнов А.А. 48 *Khohlov A.F., Brovchenko B.V., Smirnov A.A.*

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ НУКЛЕОЗИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ (НИОТ) – ФОСФАЗИДА И ЛАМИВУДИНА

DEVELOPMENT AND REGISTRATION OF A COMBINED DRUG FOR THE TREATMENT OF HIV INFECTION ON THE BASIS OF ON NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS (NRTI) PHOSPHAZIDE AND LAMIVUDINE

Секция «Лекарственные средства из природного сырья» ***«Drug from Natural Raw Materials» section***

Горелова Е.Г., Кузнецова О.Ю., Гильманов Р.З. 62 *Gorelova E.G., Kuznetsova O.Yu., Gilmanov R.Z.*

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ БЕРЕЗОВЫХ ПОЧЕК

A METHOD FOR PRODUCING AND RESEARCH OF BIRCH BUDS EXTRACTS

Секция «Нанотехнологии в медицине и фармацевтике» ***«Nanotechnology In Medicine And Pharmaceutics» section***

Станишевская И.Е., Стойнова А.М., Марахова А.И., Станишевский Я.М. 66 *Stanishevskaya I.E., Stoinova A.M., Marakhova A.I., Stanishevskiy Ya.M.*

НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА: ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЯХ

SILVER NANOPARTICLES: PREPARATION AND USE FOR MEDICAL PURPOSE

Раздел «Биотехнология»

Киреев М.Н., Волох О.А., Никифоров А.К.

КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ: СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ СОЗДАНИИ ТРАНСДЕРМАЛЬНЫХ ФОРМ ВАКЦИН

70

Будыльская Т.В., Бырихина Д.В., Государев А.И., Гусарова В.Д., Ижаева Ф.М., Михайлов П.В., Гусаров Д.А.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ГЛФ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

74

Гусаров Д.А.

ВИРУСНАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

86

Жученко М.А.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ ВАКЦИН ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ (ОБЗОР)

92

«Biotechnology» part

Kireev M.N., Volokh O.A., Nikiforov A.K.

NATURAL BIOPOLYMER-BASED COMPOSITES: PROPERTIES AND PROSPECTS OF UTILIZATION IN CONSTRUCTING TRANSDERMAL FORMULATION OF VACCINES

70

Budylskaya T.V., Byrikhina D.V., Gosudarev A.I., Gusarova V.D., Izhaeva F.M., Mikhailov P.V., Gusarov D.A.

PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF FORMULATION BASED ON BIOPHARMACEUTICAL PREPARATIONS FOR GENE THERAPY

74

Gusarov D.A.

VIRAL BIOSAFETY OF BIOPHARMACEUTICALS

86

Zhuchenko M.A.

THE RECOMBINANT ANTIGENS FOR VACCINES FOR THE TREATMENT OF PAPILLOMAVIRUS (REVIEW)

92

Раздел «Аналитические методики и методы контроля»

Секция «Контроль качества химико-фармацевтических препаратов»

Львова А.А., Шохин И.Е., Меньшикова Л.А., Комаров Т.Н., Болдина Ю.Е., Медведев Ю.В.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА ДЛЯ ТЕСТА КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

100

Эпштейн Н.А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ПРЕЦИЗИОННОСТИ (ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ) ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК В ФАРМАЦИИ

106

Секция «Поиск и разработка новых лекарственных средств»

Мазуркова Н.А., Кукушкина Т.А., Высочина Г.И., Ибрагимова Ж.Б., Лобанова И.Е., Филиппова Е.И., Мазурков О.Ю., Макаревич Е.В., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ МАНЖЕТКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*ALCHEMILLA VULGARIS* L.)

118

Кузнецова О.Ю.

ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ КОМПОЗИЦИЯМИ БЕРЕЗОВОГО ГРИБА ЧАГА

128

«Analytical and Quality Control Methods» part

«Quality Control of Chemical Drug Products» section

Lvova A.A., Shohin I.E., Menshikova L.A., Komarov T.N., Boldina Yu.E., Medvedev Yu.V.

VALIDATION OF UV-SPECTROMETRY ASSAY METHOD FOR DISSOLUTION PROFILE TEST FOR LEVOFLOXACINE TABLETS

100

Epshtein N.A.

INTERMEDIATE PRECISION DETERMINATION AT VALIDATION OF METHODS IN PHARMACY

106

«New Drug Search and Development» section

Mazurkova N.A., Kukushkina T.A., Vysochina G.I., Ibragimova Z.B., Lobanova I.E., Filippova E.I., Mazurkov O.Yu., Makarevich E.V., Shishkina L.N., Agafonov A.P.

STUDY OF ANTIHERPETIC ACTIVITY OF LADY'S MANTLE (*ALCHEMILLA VULGARIS* L.) EXTRACTS

118

Kuznetsova O.Yu.

REVIEW OF MODERN ADVANCED MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS OF CHAGA MUSHROOM BIRCH

128

Секция «Контроль качества лекарственного растительного сырья»

«Quality Control of Herbal Drug Products» section

Тринеева О.В., Сливкин А.И. **142** *Trineeva O.V., Slivkin A.I.*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА СЫРЬЯ И МАСЛЯНОГО ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PIGMENT COMPOSITION FROM RAW MATERIALS AND OIL EXTRACT OF NETTLE LEAVES

Марахова А.И., Сорокина А.А., Станишевский Я.М. **150** *Marakhova A.I., Sorokina A.A., Stanishevskiy Ya.M.*

ПРИМЕНЕНИЕ ПРИНЦИПА СКВОЗНОЙ СТАНДАРТИЗАЦИИ В АНАЛИЗЕ ФЛАВОНОИДОВ ТРАВЫ ПУСТЫРНИКА И ПРЕПАРАТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

APPLICATION OF THROUGH STANDARDIZATION PRINCIPLE IN THE ANALYSIS OF FLAVONOIDS MOTHERWORT (*LEONURUS*, L.) HERB AND IT'S PREPARATION

Жилкина В.Ю., Марахова А.И., Станишевский Я.М. **156** *Zhilkina V.Yu., Marakhova A.I., Stanishevskiy Ya.M.*

ИЗУЧЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В СБОРЕ ВИТАМИННОМ

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALISIS OF ORGANIC ACIDS IN MIXTURE OF MULTIVITAMIN RAW MATERIAL

Раздел «Эффективность и безопасность лекарственных средств»

«Drug Products Efficacy and Safety» part

Секция «Кинетика растворения»

«Dissolution Profile Test» section

Дубовик Н.С., Шохин И.Е., Павлова Л.А. **160** *Dubovik N.S., Shohin I.E., Pavlova L.A.*

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АВТОМАТИЗАЦИИ НА ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» НА ПРИМЕРЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «БЕТАСЕРК, ТАБЛЕТКИ 16 МГ»

EVALUATION OF THE AUTOMATION INFLUENCE ON THE DISSOLUTION VARIABILITY RESULTS FOR BETASERC TABLETS

Гребёнкин Д.Ю., Станишевский Я.М., Шохин И.Е. **166** *Grebenkin D.Yu., Stanishevskiy Ya.M., Shohin I.E.*

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОВЕДЕНИЮ СРАВНИТЕЛЬНОГО ТЕСТА КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ (ОБЗОР)

MODERN APPROACHES OF DISSOLUTION PROFILE TEST (REVIEW)

Секция «Доклинические исследования»

«Preclinical Trials» section

Пономаренко Е.В. **172** *Ponomarenko E.V.*

ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГУАНИДИНИЕВОЙ СОЛИ 2-АМИНОФЕНИЛСУЛЬФОКИСЛОТЫ

ANTIDIABETIC ACTIVITY OF GUANIDINIUM SALT 2-AMINOPHENYLACETATE

Секция «Биоаналитические методики»

«Bioanalytical Methods» section

Сорокоумов П.Н., Савельева Е.И., Каракашев Г.В., Копейкин В.А., Радилов А.С. **176** *Sorokoumov P.N., Savelieva E.I., Karakashev G.V., Kopeikin V.A., Radilov A.S.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЛЬДОНИЯ, ГАММА-БУТИРОБЕТАИНА И КАРНИТИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

DETERMINATION OF MELDONIUM, γ-BUTYROBETAINE, AND CARNITINE IN BLOOD PLASMA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH MASS-SELECTIVE DETECTION

Егоренков Е.А., Смирнов В.В. **184** *Egorenkov E.A., Smirnov V.V.*

«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

«COCKTAIL» METHODS OF CYTOCHROME P450 ISOFORMS ACTIVITY DETERMINATION *IN VIVO* USING BIOANALYTICAL METHODS: ACTUAL METHODS REVIEW AND OPPORTUNITIES OF THEIR APPLICATION IN CLINICAL PRACTICE

Абдрашитов Р.Х., Петухов А.Е., Смирнов В.В. **190** *Abdrashitov R.K., Petukhov A.E., Smirnov V.V.*

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИНОЛИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТА 6-ГИДРОКСИ-1,2,3,4-ТЕТРАГИДРО-БЕТА-КАРБОЛИНА С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТА CYP2D6

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF BIOANALYTICAL METHOD FOR QUANTIFICATION OF PINOLINE AND ITS METABOLITE 6-OH-1,2,3,4-TETRAHYDROCARBOLINE FOR THE PURPOSE OF CYPD26 ACTIVITY DETERMINATION

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

Соснов А.В., Садовников С.В., Семченко Ф.М., Руфанов К.А., Тохмахчи В.Н., Соснова А.А., Тюрин И.А. **196** *Sosnov A.V., Sadovnikov S.V., Semchenko F.M., Rufanov K.A., Tohmahchi V.N., Sosnova A.A., Tyurin I.A.*

СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИЕ НЕНАРКОТИЧЕСКИЕ АНАЛЬГЕТИКИ КАК НАПРАВЛЕНИЕ РАЗВИТИЯ ФАРМАЦЕВТИКИ

POTENT NON-NARCOTIC ANALGESICS AS A DIRECTION IN DEVELOPMENT OF PHARMACEUTICALS

Зайцев С.А., Басевич А.В., Хрусталева А.О. **208** *Zaitsev S.A., Basevich A.V., Hrustaleva A.O*

ПРОЦЕДУРА ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВЫБОРА ПОСТАВЩИКОВ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

THE PROCEDURE OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT SUPPLIERS PRELIMINARY CHOICE FOR MEDICINE MANUFACTURE

Соснов А.В., Голубев С.С., Пункевич Б.С., Садовников С.В., Загребин Е.М., Родина И.С., Семченко Ф.М., Соснова А.А. **216** *Sosnov A.V., Golubev S.S., Punkevich B.S., Sadovnikov S.V., Zagrebin E.M., Rodina I.S., Semchenko F.M., Sosnova A.A.*

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ КОНТРОЛИРУЕМЫХ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ ПРЕПАРАТОВ АНАЛЬГЕТИКОВ

REFERENCE STANDARDS OF ACTIVE INGREDIENTS OF POTENT ANALGESIC DRUGS

Подпружников Ю.В., Шестаков В.Н. **224** *Podpruznikov Yu.V., Shestakov V.N.*

РИСК-АНАЛИЗ НЕСООТВЕТСТВИЙ, ВЫЯВЛЯЕМЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ GMP-ИНСПЕКЦИЙ

RISK ANALYSIS OF THE DEFICIENCIES FOUND BY THE GMP INSPECTIONS

Наркевич И.А., Голант З.М., Карташова Н.С. **232** *Narkevitch I.A., Golant Z.M., Kartashova N.S.*

УСТАНОВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПИСАНИЯ ОБЪЕКТА ГОСУДАРСТВЕННОЙ ЗАКУПКИ «ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ» КАК НЕОБХОДИМОЕ УСЛОВИЕ ПРЕДОСТАВЛЕНИЯ ПРЕФЕРЕНЦИЙ ЛОКАЛЬНЫМ ПРОИЗВОДИТЕЛЯМ

ESTABLISHMENT OF FEATURES DESCRIPTION OF OBJECT GOVERNMENT PROCUREMENT «MEDICINAL PRODUCTS» AS A CONDITION OF GRANTING PREFERENCES TO LOCAL PRODUCERS

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

Гузев К.С. **238** *Guzev K.S.*

О ГАЛЕНЕ (СТРАНИЦЫ ЖИЗНИ И ЧЕРТЫ ЛИЧНОСТИ В ОЦЕНКЕ ПОТОМКОВ)

ABOUT GALEN (PAGES OF LIFE AND TRAITS OF THE PERSON IN THE ASSESSMENT OF THE DESCENDANTS)

Публикации партнеров **248** ***Partner Publications***

Дорогие читатели!

Вы держите в руках очередной номер научно-производственного рецензируемого журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». Однако данный номер немного отличается от привычных Вам. Во-первых, все материалы, опубликованные на страницах нашего издания, теперь считаются т.н. ВАКовскими публикациями. 29 декабря 2015 года Минобрнауки России включило журнал 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.

Мы поздравляем Вас, наши дорогие читатели и авторы, с этим знаменательным событием! Будем рады продолжить достоверную и оперативную публикацию результатов Ваших разработок и исследований новых лекарственных препаратов на страницах журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Новый статус издания – признание нашего вклада в развитие отечественной науки. Это обусловило широкий интерес экспертов фармацевтического рынка к предоставлению более глубоких и развернутых материалов по актуальным для профильного сообщества вопросам. Поэтому в этот раз мы отошли от традиции подборки комментариев экспертов по ключевым на момент выхода номера из типографии вопросам трансформации российского фармацевтического рынка в редакционной статье. Это не значит, что на страницах нашего издания не будет таких мнений. Напротив, в данном номере представлены более широкие экспертные мнения по самым разным вопросам:



– Вопросы ценообразования на лекарственные препараты с учетом актуальных изменений, вносимых постановлением Правительства Российской Федерации от 15 сентября 2015 г. № 979 «О внесении изменений в постановление Правительства Российской Федерации от 29 октября 2010 г. № 865 и об утверждении методики расчета устанавливаемых производителями лекарственных препаратов предельных отпускных цен на лекарственные препараты, включенные в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, при их государственной регистрации и перерегистрации». Здесь Вы сможете ознакомиться с разъяснениями юристов по подготовке документов для регистрации (перерегистрации) предельных отпускных цен производителей на лекарственные препараты, включенные в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Также в этом материале Вы найдете информацию относительно регистрации цен на лекарственные препараты, произведенные на территории государств-членов ЕАЭС и иных стран. Узнаете о понижающих коэффициентах при расчете цен на воспроизведенные и биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты и иностранные лекарственные препараты. [Материал представлен на С. 18–22.]

– Принципиальные моменты соответствия фармпредприятий GMP и выявления в ходе GMP-инспекций несоответствий. В этом материале сотрудники ФБУ «ГИЛС и НП», осуществляющие аудит фармацевтических предприятий, максимально полно представляют информацию о

критических и существенных несоответствиях производственных площадок правилам надлежащей производственной практики. Здесь же Вы найдете рекомендации по устранению типичных нарушений, информацию об их интерпретации в ходе присвоения GMP-инспекцией уровня критичности выявленному несоответствию. [Подробнее читайте материал на страницах нашего издания С. 224–230.]

– Специфика сферы государственных закупок лекарственных препаратов в условиях действия преференций для национальных производителей. В материале, подготовленном при участии ректора Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии также представлены предложения по совершенствованию нормативного пространства в области государственных закупок. [Ознакомиться с анализом закупок лекарственных препаратов разных производителей, обладающих одинаковым международным непатентованным наименованием (МНН) и находящихся в обращении на национальном рынке, Вы можете на С. 232–236.]



– Практические рекомендации по выбору поставщиков активных фармацевтических субстанций для производства лекарственных препаратов, специфика производства сильнодействующих ненаркотических анальгетиков и другие актуальные направления развития фармацевтики, а также рекомендации по оснащению лабораторий, специализирующихся на разработке твердых лекарственных форм.

Из новинок, интересных нашим читателям, стоит отметить появление нового раздела «Биотехнология». Все больше предприятий при разработке высокоэффективных лекарственных препаратов задействуют биологические технологии и методики. Принят ряд государственных программ по стимулированию организации производства биотехнологических субстанций. В этой связи в прошлом номере мы создали секцию, посвященную вопросам биофармацевтического производства. Однако в период подготовки текущего номера интерес и отзывы наших читателей и авторов продемонстрировали необходимость создания полноценного раздела. Надеемся, что новый раздел будет популярен и полезен для специалистов Вашего предприятия.

И, конечно же, на страницах нашего издания Вы найдете статьи, в которых рассматриваются научные и практические направления разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, внедрения технологий и оборудования, создания стандартных и терапевтически эффективных лекарственных препаратов, разработки аналитических методик контроля качества производимых продуктов и методик оценки эффективности и безопасности находящихся в обращении на российском рынке лекарственных средств. Наши партнеры по сложившейся традиции представляют информацию о новинках технологического, контрольно-аналитического и общелабораторного оборудования.

Надеемся, что материалы, представленные на страницах нашего издания, будут интересны и полезны Вам при разработке и регистрации новых, качественных и эффективных лекарственных средств.

PHARMTECH & INGREDIENTS 2015

24–27 ноября 2015 года на территории Московской области прошла 17-я Международная выставка оборудования, сырья и технологий Pharmtech & Ingredients. Несмотря на то, что в этом году выставка сменила привычный для специалистов фармрынка павильон ВДНХ на «Крокус Экспо», в выставочной экспозиции приняли участие более 300 российских и зарубежных компаний. Уже первый день выставки привлек значительное число посетителей. По данным организаторов – Группы компаний ITE, занимающей лидирующие позиции на рынке выставочных услуг России, в 2015 году выставку посетили 5984 человека из 54 регионов России и 45 зарубежных стран – на 5% больше, чем в прошлом году.



24 ноября состоялось торжественное открытие ключевой выставки фармацевтической промышленности России и рынка ЕАЭС. В этом году в адрес гостей и участников выставочной экспозиции свои приветствия направили министр промышленности и торговли **Д.В. Мантуров**, заместитель министра экономического развития **О.С. Фомичев** и руководители профессиональных ассоциаций российских фармпроизводителей. От лица Министерства промышленности и торговли Российской Федерации посетителей выставки приветствовала директор департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности **О.Н. Колотилова**. **Ольга Николаевна** отметила ведущую роль выставки в отрасли, которая выступает индикатором фарминдустрии в целом: «На площадке выставки представлены фармацевтические компании из многих стран мира. Они демонстрируют инновационные технологии и новинки оборудования полного цикла производства лекарственных препаратов. Мероприятие – мощный стимул для развития конкурентоспособной фармацевтической индустрии».

Слова директора департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России наглядно подтвердили участники выставки. В частности, ведущий химико-фармацевтический холдинг России **ГК «Фармконтракт»** представил в этом году новинки не только зарубежных, но и отечественных производителей для фармпроизводств – на стенде Минпромторга России были продемонстрированы отечественные разработки в области аналитического и пилотного технологического оборудования. На стенде коллективной экспозиции российских производителей под эгидой Минпромторга России был представлен полуавтоматический тестер распадаемости **OLpharmPRO D-2**. Прибор позволяет индивидуально определять время распадаемости каждого образца. При этом, как отметил менеджер **ГК «Фармконтракт»**, полученные данные автоматически отражаются в отчете, что позволяет исключить самую минимальную погрешность из-за человеческого фактора. Из достоинств прибора стоит отметить автоматический подъем корзинок после завершения теста и эргономичную конструкцию с магнитным креплением корзинок, что обеспечивает удобство при загрузке образцов. Также инжиниринговое подразделение холдинга представило архитектурно-планировочный макет фармацевтического завода по выпуску инфузионных растворов в разрезе с демонстрацией планировочных решений, расстановки технологического оборудования производственного корпуса. Планировочные решения производственного корпуса разработаны с учетом ограждающих конструкций (глухие и остекленные стеновые панели, двери фармацевтического исполнения, растровый подвесной потолок, модули фильтрации и распределения воздуха, воздушные шлюзы и передаточные окна) и прочих элементов чистых помещений. Данные элементы производятся компанией в России и выпускаются под торговой маркой **MTEX**.

В рамках коллективной экспозиции российских производителей под эгидой Минпромторга России директору департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности **О.Н. Колотиловой** свои разработки представили «Артлайф», «ВИПС-Мед», «ТНК Силма», Уральский стекольный завод, ГК «Герофарм», «Форт», Пермская химическая компания, технопарк НИУ ИТМО, «Полисорб», «АВВА РУС», «ИФАР», НПК «Наносистема», «Биосинтез», «Рафарма», «Нанолек», ГНЦ РФ – ФЭИ и др.

Существенный вклад выставки Pharmtech & Ingredients в развитие фармацевтического рынка подтверждает и тот факт, что мероприятие ежегодно поддерживают профильные министерства и ведомства, регулирующие национальный лекарственный рынок, а также авторитетные отраслевые объединения. В этом году мероприятие прошло при поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, Комитета Государственной Думы Федерального Собрания Российской Федерации по промышленности, министерства инвестиций и инноваций Московской области, Торгово-промышленной палаты Российской Федерации, Российского союза промышленников и предпринимателей, Союза профессиональных фармацевтических организаций, Ассоциации российских фармацевтических производителей и Ассоциации международных фармацевтических производителей. Спонсором выставки по уже сложившейся традиции выступила **Группа компаний «Фармконтракт»**.



Как и в предыдущие годы, **ГК «Фармконтракт»** представила на выставке одну из самых репрезентативных экспозиций оборудования для фармацевтического и биотехнологического производства. Отличительной особенностью экспозиции 2015 года стало представление полного пакета услуг (решений) по созданию готовых производственных комплексов. В частности, компания осуществляет проектирование, строительство и инжиниринг будущего производства любой сложности и производственной мощности, включая создание чистых помещений. При этом все конструкции и элементы чистых помещений производятся собственными силами. В то же время за счет одной из крупнейших на российском рынке баз технологического и лабораторного оборудования для любого сегмента (от признанных и известных во всем



мире производителей оборудования, а также производителей так называемого среднего ценового уровня до бюджетных аналогов, надлежащего качества) **ГК «Фармконтракт»** проводит оснащение производственных цехов и технологических линий будущего предприятия, отделов контроля качества и лабораторий. Специалисты сервисной службы компании обеспечивают IQ/OQ/PQ-квалификацию и валидацию данного парка оборудования, осуществляют его запуск и проводят гарантийные и постгарантийные работы. В качестве примера организации технологического процесса на фармпроизводстве на стенде **ГК «Фармконтракт»** была представлена ректификационная установка **BuchiGlasUster** для разделения растворов, содержащих 2 и более компонентов с близкими температурами кипения. Швейцарские партнеры холдинга специально на Pharmtech & Ingredients привезли многоцелевой пробоотборник MPS **Gerstel** для хроматографии, который обеспечивает высокую производительность и пропускную способность (пробопоток – 3456 образцов в 36 микролунках планшета).

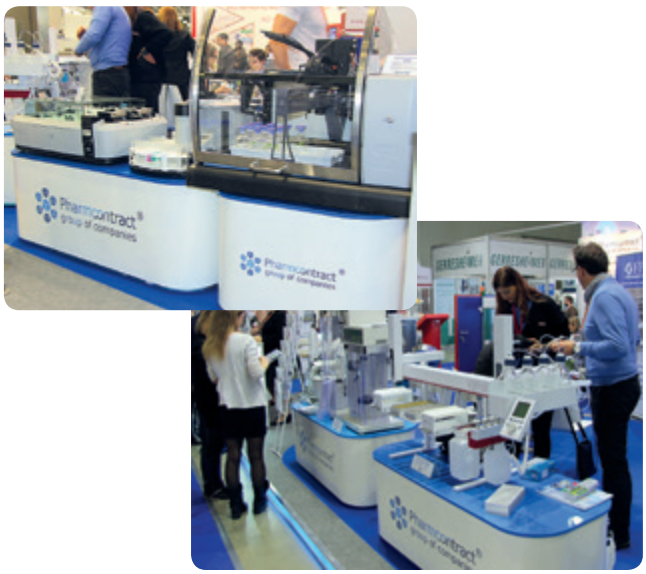
Помимо оборудования и решений для фармацевтической и биотехнологической промышленности, в первый день выставки **ГК «Фармконтракт»** представила анонс готовящегося к выпуску в текущем году практического пособия *«Красная» биотехнология: от науки к промышленности*. В пособии приведен ряд примеров организации этапов разработки, масштабирования и серийного выпуска биотехнологической продукции. Также в практическом пособии *«Эффективные решения для биотехнологической и фармацевтической промышленности»* собран ряд кейсов по организации процесса получения моноклональных антител, биоаналога инсулина – гларгина, вакцин, фракционирования плазмы, генно-инженерных препаратов из растений и множество других востребованных решений поставленных рынком задач. «XXI век для фармацевтической индустрии все больше становится веком биотехнологий. По прогнозам экспертов и исследователей, биологические лекарственные средст-



ва смогут в разы улучшить качество жизни людей за счет разработки новых схем лечения на основе применения лекарственных средств биологического происхождения. Существенный интерес к биофармацевтическим лекарственным препаратам 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 средств медицинского назначения, но и для профилактики заболеваний. Именно поэтому холдинг **ГК «Фармконтракт»** совместно с **GE Healthcare** занялись подготовкой такого издания», – отметил президент холдинга **Сергей Быковский**.

Вопросам биотехнологий был посвящен и ежегодный семинар, который организует на площадке Pharmtech & Ingredients **ГК «Фармконтракт»** вместе с одним из авторитетнейших СМИ отрасли (журналом *«Разработка и регистрация лекарственных средств»*). Подробнее о прошедшем семинаре **«Разработка и регистрация лекарственных средств: технологические аспекты»** читайте на страницах нашего номера С. 13–17.

Не менее интересным первый день выставки оказался и в плане насыщенной деловой программы, которую открыл круглый стол по контрактному производству. В рамках мероприятия директор департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **О.Н. Колотилова** представила взгляд государственного сектора на процесс внедрения на территории России контрактного производства. **Ольга Николаевна** отметила, что на сегодняшний день преференции Минэкономразвития России отечественным производителям готовых лекарственных форм при государственных закупках составляют 15%. В последующем Минпромторг России планирует предоставлять преференции в размере 30% производителям готовых лекарственных форм, которые готовы перейти на полную локализацию своего производства, включающую производство фармсубстанций. Также министерство совместно с другими профильными государственными ведомст-



вами продолжает совершенствовать законодательство в области поддержки отечественных производителей лекарственных средств. К примеру, **О.Н. Колотилова** напомнила, что сейчас идет обсуждение возможности признания владельцев специнвестконтрактов единственными поставщиками локализованной продукции. Директор департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России отметила позитивную тенденцию мер государственной поддержки отечественных производителей: «В сегменте государственных закупок доля российских лекарств существенно выросла за первое полугодие 2015 года. Сейчас она составляет 44% от общего объема».

Участники круглого стола *«Контрактное производство: практический опыт реализации. Взгляд двух сторон»* отметили существенное изменение ситуации с контрактным производством за последние годы. В частности, увеличилась доля предприятий, для которых контрактное производство – весомый вектор стратегического развития. Участники фармацевтического рынка накопили определенный опыт партнерского взаимодействия. Этот опыт позволяет оценить возможные риски, финансово-экономические аспекты сотрудничества, расширить номенкла-





туру лекарственных средств, выпускаемых на территории Российской Федерации, и сделать их более доступными для населения. В то же время, по словам исполнительного директора СПФО **Л.В. Титовой**, участие российских предприятий в контрактном производстве требует соответствия уровня их производства мировым стандартам качества.

Говоря о преимуществах и недостатках контрактного производства, участники круглого стола отметили среди плюсов следующие моменты:

– если объем продаж продукта не оправдывает строительства собственного завода, то расширение контрактного портфеля за счет производственных мощностей контрагента выгодно обеим сторонам. «Подобным способом ряд производителей заполняют не полностью загруженные линии», – отметила Лилия Викторовна;

– иностранным производителям соглашения по контрактному производству предоставляют возможность получить статус локализованного продукта;

– российские контрактные площадки отвечают всем необходимым требованиям по наличию оборудования, по контролю качества выпускаемой продукции.

Однако, несмотря на ряд преимуществ как для российских, так и для зарубежных фармкомпаний, российский рынок контрактного производства окончательно еще не сформировался – он находится на этапе совершенствования. Некоторые эксперты убеждены, что более эффективному развитию рынка препятствует правовая основа: национальное законодательство требует уточнения ряда нюансов в части разрешения «контрактнику» принимать заказы и производить под одним и тем же МНН большое количество препаратов.

Круглый стол вызвал широкий интерес у участников рынка – его посетили порядка 130 специалистов отрасли: топ-менеджеры российских и иностранных компаний, руководители фармацевтических кластеров и эксперты.

Pharmtech & Ingredients – это крупнейшая по количеству посетителей в России и ближнем зарубежье международная выставка, где представлен широкий спектр оборудования, сырья, ингредиентов и проектно-технологических решений для фармацевтического производства. По словам участников выставочной экспозиции, уже второй день выставки подтвердил ее значимость и авторитет среди специалистов фармрынка. Как отметили представители официального спонсора мероприятия – ведущего химико-фармацевтического холдинга России **ГК «Фармконтракт»**, только за первые два дня выставки стенд компании посетило порядка 250 гостей.

В рамках выставочной экспозиции второго дня Pharmtech & Ingredients руководитель отдела ГЛФ **ГК «Фармконтракт»** рассказал гостям выставки о возможностях новой линейки технологического оборудования для производства готовых лекарственных форм. «Учитывая потребности российских фармпроизводителей и их требования к компактности, высокой эффективности и минимизации простоя, максимальной универсальности оборудования при производстве ГЛФ, мы разработали принципиально новое и в какой-то мере альтернативное решение на базе оборудования из категории среднего ценового сегмента», – отметил **Александр Гринченко**. Так, для выпуска твердых желатиновых капсул холдинг предлагает полностью автоматизированную машину фасовки капсул, пеллет в твердые желатиновые капсулы SMART-1 от **CADMACH**. Данный комплекс обеспечивает производительность предприятия до 3000 капсул в час. Процесс таблетирования может быть выполнен на таблеточных прессах CADMACH. Для фасовки таблеток и капсул в блистерную упаковку PVC/ALU на предприятиях малой производительности оптимальным решением станет автоматическая **блистерная машина R2 от CUBE**. Несмотря на свои габариты, машина отличается высокой производительностью – до 50 блистеров в минуту. Еще одним вариантом для небольших производственных площадок станет компактная автоматическая линия настольного исполнения для фасовки суппозиториев, охлаждения и обрезки ленты



от **PAKMATIK**. При необходимости проведения фасовки таблеток и капсул в банки с учетом изменения размера этих лекарственных форм, но без смены форматных частей можно использовать автоматические счетно-фасовочные машины **AUTOPACK**. Аналогичное решение, но уже для фасовки жидких и вязких нестерильных лекарственных форм могут обеспечить автоматические моноблоки **IMACO**.

Помимо демонстрации принципов работы оборудования для фармацевтических производств различных лекарственных форм, **ГК «Фармконтракт»** в этом году организовала совместно со своим итальянским партнером, производителем оборудования для чистых помещений компанией **FPS**, своеобразный дискурс по применению барьерных технологий при работе с сильнодействующими активными фармацевтическими субстанциями. Технический специалист отдела продаж компании FPS **Stefano Butti** и инженер-технолог ГК «Фармконтракт» **Дмитрий Ткач** представили обзор существующих и применяемых сегодня в фармацевтической промышленности изолирующих технологий. Как отметили докладчики, данные технологии используются в процессах фильтрования, сушки, помола, микронизации, смешивания, таблетирования, заполнения капсул, упаковки, розлива и межоперационного контроля качества. Данные технологии, которые нередко называют «барьерными технологиями», включают в себя местную вытяжную вентиляцию, чистые помещения, шкафы с ламинарным потоком воздуха, кабинеты с воздушным занавесом, изоляторы загрузки реакторов, изоляторы укупорки, гибкие и жесткие барьерные изоляторы, барьерные системы ограниченного доступа.

Для обеспечения процесса измельчения (помола) итальянская компания FPS разработала дробильные машины (размер продукта достигает от 50 до 2 см), механические мельницы (продукт может быть измельчен до размеров 5 см – 30 микрон) и струйные мельницы (обеспечивают измельчение продукта до 3 микрон). На российском фармацевтическом рынке эти приборы, перекрывающие потребности любой лаборатории и производства, представляет **ГК «Фармконтракт»**. Как подчеркнул **Stefano Butti**, компания имеет собственный испытательный центр, где возможно провести контроль оборудования для размола и микронизации на предмет оптимизации режима работы и соответствия конкретной задаче: «Это позволяет нам разрабатывать и предлагать производителям активных фармацевтических ингредиентов инновационные решения в области микронизации данных продуктов».

Говоря об определении групп веществ по показателю предельно допустимой концентрации в воздухе рабочей зоны, господин **Butti** привел в качестве наглядного примера соотношение 1 мкг лактозы к 1 м^3 воздуха как соотношение размера игральной кости со



зданием Эмпайр-стейт-билдинг. Также **Stefano Butti** и **Дмитрий Ткач** рассказали участникам семинара о принципах конструкции и работы изоляторов с жесткими стенками, барьерных изоляторов и о других продуктах, которые производит FPS для лабораторий, пилотных производств и промышленных предприятий.

В заключении отметим, что выставка Pharmtech & Ingredients – это не только 13505 м^2 выставочной экспозиции, где представлены современные достижения фармацевтической промышленности в области технологического, аналитического и лабораторного оборудования, но также образцы различных лекарственных форм, инжиниринговые решения и упаковка. Pharmtech & Ingredients – это высокопрофессиональная площадка, где представители регуляторных органов, эксперты отрасли и участники рынка активно обсуждают, совместными усилиями ищут пути решения проблем, препятствующих развитию фармацевтической промышленности. Здесь производители и дистрибьюторы оборудования для фармотрасли проводят квалификационные срезы потребностей заводов и компаний-производителей лекарственных средств в новых технологических линейках и методиках с целью их адаптации под исследовательские и производственные задачи. В свою очередь, сотрудники предприятий получают возможность узнать о новинках в области приборостроения и технологий производства лекарственных форм, методов исследования и контроля качества производимых продуктов. Не остаются без внимания на Pharmtech & Ingredients и будущие специалисты фармацевтической отрасли, студенты. Ежегодно в рамках выставки проходит образовательный проект Pharmtech Tutor, благодаря которому студенты профильных специальностей фармацевтических образовательных учреждений получают практические навыки, проходят мини-стажировку, которая нередко трансформируется в полноценную стажировку на производстве.

Следующая, 18-я Международная выставка оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства Pharmtech & Ingredients пройдет **22–25 ноября 2016 года** в МВЦ «Крокус Экспо».

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ: ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

24 ноября 2015 года в рамках выставки Pharmtech & Ingredients научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» провел один из самых посещаемых семинаров. По традиции мероприятие было посвящено технологическим аспектам процесса разработки и производства лекарственных препаратов. Ключевой темой семинара этого года стало такое актуальное направление развития фармотрасли, как биотехнология.





Семинары научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» – одно из самых ожидаемых мероприятий на профильных отраслевых выставках. Мероприятия вызывают большой интерес у топ-менеджеров, генеральных директоров фармацевтических компаний и заводов, специалистов ОКК, отделов разработки, регистрации, производства, развития, технологов, научных сотрудников и экспертов фармацевтического рынка. В этом году организаторы предложили для обсуждения вопросы, связанные с биотехнологией и биофармацией: биофармацевтическая продукция, технологии коррекции биофармацевтических характеристик лекарственных средств, создание инновационных лекарственных форм и их модификаций и др.

Открыл семинар профессор, д.х.н. руководитель **испытательного центра «ОЛФАРМ» И.А. Василенко**. В своем докладе **Иван Александрович** осветил ключевые вехи становления и развития биотехнологии как науки и биофармацевтической продукции. Биотехнологическая промышленность включает в себя производство сыра, вина, пива, дрожжей, хлебопекарных изделий, продуктов молочнокислого брожения. Но раньше, занимаясь производством данных продуктов, люди не подозревали, что занимаются развитием биотехнологий. Само понятие «биотехнология» появилось лишь в 60-х годах XX столетия. На третьем съезде Европейской ассоциации биотехнологов (Мюнхен, 1984 г.) голландский ученый Е. Хаувинк провел этапизацию биотехнологии:

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 гг.): 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 внедрения в производство достижений генной инженерии (с 1960 г. по настоящее время): использование генной и клеточной инженерии для получения биотехнологической продукции.

Одним из первых биологических продуктов на основе белков, зарегистрированных на рынке США, был белок крови, так называемый фактор VIII (для лечения гемофилии), первые продажи начались в 1966 году.

Фактор VIII, отвечающий за нормальное свертывание крови, был изготовлен из крови человека, полученной от доноров.

Впервые термин «биофармацевтика» (Biopharmaceuticals) был предложен в начале 1980-х годов. Первые разрешения на производство были выданы в конце этого десятилетия на такие препараты, как инсулин, затем гормон роста для лечения карликовости – соматотропин. Первой генно-инженерной вакциной, одобренной для использования в Соединенных Штатах, стала вакцина против гепатита В (1986 год). Вакцина была создана путем вставки части вируса гепатита В в клетки дрожжей. В этом же году были одобрены для терапевтических целей моноклональные антитела (МКА) и альфа-интерферон. В 1989 году FDA утвердил эритропоэтин (ЭПО) – белок, полученный на основе генно-инженерных технологий. Сегодня биофармацевтическая продукция имеет следующую классификацию:

- Антибиотики.
- Витамины.
- Препараты, полученные из природных источников (гепарин, актовегин, церебролизин, гиалуроновая кислота, декстраны).
- Белковые препараты, полученные на основе генно-инженерных технологий: инсулин, эритропоэтин, интерфероны, соматропин, моноклональные антитела, ферменты.
- Препараты на основе низкомолекулярных веществ (сахара, липиды, жиры, аминокислоты).

Разработка и производство лекарственных препаратов на основе биологического сырья (животные, микроорганизмы, растения) осуществляется на базе технологического оборудования, прошедшего квалификацию и удобного для проведения процедуры очистки. Примеры такого оборудования **И.А. Василенко** привел, иллюстрируя технологическую схему производства биофармацевтических субстанций. Для процесса ферментации оптимальным является оборудование GE Healthcare: биореакторы XDR 50, 1000 и 2000. Для сепарации биомассы подходит нутч-фильтр BuchiGlasUster и вертикальная фильтрующая центрифуга HEINKEL. Очистку биомассы можно проводить с помощью хроматографической системы GE Healthcare ÄKTA Ready. При промышленном производстве биомассы для очистки используются препаративные хроматографы BIORAD. Сушку биомассы проводят в распылительной сушилке MiniSprayDryerB-290 BUCHI.

Говоря о будущем биофармацевтической промышленности, **Иван Александрович** отметил такие направления развития, как создание штаммов-продуцентов, усовершенствование технологии очистки и выделения белков, разработка систем доставки лекарственных препаратов, использование ферментов на стадии модификации фармацевтически активных молекул, усовершенствование нормативно-правовой базы обращения биофармацевтической продукции.

О будущем биофармацевтической промышленности рассказала профессор, д.фарм.н. редактор раздела «Фармацевтическая технология и нанотехнологии» **журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» Н.Б. Демина**. **Наталья Борисовна** отметила, что в XX веке биофармация понималась как наука, изучающая биологическое действие лекарственных препаратов в зависимости от фармацевтических факторов. В XXI веке к этому определению добавили пояснение, существенно расширяющее горизонты развития биофармации: это наука, еще и «применяющая полученные знания с целью разработки и производства эффективных и безопасных лекарственных препаратов». В 1995 году FDA утвердила биофармацевтическую классификационную систему (БКС), которая применяется для разработки условий теста «Растворение», прогноза терапевтической эффективности и обоснования процедуры «биовейвер». Это инструмент для последующего обоснования состава вспомогательных веществ, дизайна и технологии лекарственной формы.

Таблица 1.

Биофармацевтическая классификационная система

Класс	Биофармацевтическая растворимость	Абсорбция
1	высокая	высокая
2	низкая	высокая
3	высокая	низкая
4	низкая	низкая

На примере технологии матричных таблеток **Наталья Борисовна** привела рекомендации по подбору матрицеобразующего компонента для фармацевтических субстанций с различной растворимостью. Так, в случае субстанции 1 класса из-за быстрого всасывания наблюдается эффект достижения «пиковой» концентрации лекарственного вещества в крови, что часто служит причиной проявления побочных эффектов. Для пролонгирования профиля высвобождения таких лекарственных препаратов целесообразно примене-

ние неэрозийных полимеров с высокой вязкостью или гидрофобных матриц.

Для плохо и медленно растворимых фармацевтических субстанций, которые вследствие этого имеют неудовлетворительные характеристики биодоступности, рекомендуется создание матричных лекарственных форм на основе гидрофильных эрозийных полимеров, а также полимеров с невысокой вязкостью. Большое значение при разработке матричных лекарственных форм с такими субстанциями имеет период полувыведения, который не должен превышать 2–4 ч.

Для повышения биодоступности субстанций с ограниченной растворимостью в настоящее время разработаны и применяются различные технологии, в качестве примера спикер назвала микронизацию, аморфизацию, получение сокристаллов, твердых дисперсий и др.

Для улучшения биофармацевтических характеристик субстанций с высокой растворимостью и низкой проницаемостью также разработаны специфические технологии, одна из которых – создание мукоадгезивных лекарственных форм с длительной экспозицией на слизистой, что способствует тесному и пролонгированному контакту лекарственного препарата с тканями организма. В качестве удачного примера повышения биодоступности субстанций 4 класса был приведен лекарственный препарат «Калетра» («Эббот», Великобритания), содержащий ритонавир и лопинавир. Добиться существенного снижения побочных эффектов и повысить биодоступность таблеток позволило применение технологии экструзии расплава.

Подводя итоги, **Наталья Борисовна** отметила, что успешное создание инновационного лекарственного препарата не обязательно должно быть связано с разработкой новой эффективной молекулы, на что требуется 10–17 лет. Гораздо быстрее и экономичнее создание новой оригинальной лекарственной формы с современным дизайном, позволяющей в полной мере раскрыть терапевтический потенциал фармацевтической субстанции.

Главный редактор научно-производственного **журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» к.фарм.н. И.Е. Шохин,** представляя современный взгляд на выполнение теста кинетики растворения, отметил, что «наибольший риск неэквивалентных результатов наблюдается для лекарственных средств с низкой растворимостью субстанции (2, 4 класс по БКС), а также препаратов с модифицированным высвобождением (таблетки пролонгированного действия, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой)». Также **Игорь Евгеньевич** рассказал о преимуществах автоматизации в процессе фармацевтической разработки отдельных этапов исследования (в том числе пробоподготовки, подготовки сред растворения, выполнения анализа, обработки результатов, мойки системы, видеозапись и др.), процесса отбора проб (полуавтоматические системы), а также процесса отбора и анализа проб методом УФ/ВЭЖХ (полностью автоматические системы). Главный редактор нашего издания привел данные контент-анализа и акцентировал внимание участников семинара на актуальной литературе, нормативно-правовых актах, регламентирующих проведение экспертизы лекарственных средств.





Вторая часть семинара по традиции была посвящена кейсам от производителей оборудования, задействованного при производстве различных лекарственных форм и биофармацевтической продукции. Руководитель отдела аналитического оборудования **ООО «Фармконтракт» Г.В. Казыдуб** подробно рассказал о современной масс-спектрометрии на примере оборудования Agilent Technologies. Масс-спектрометрия – физико-химический метод анализа, основанный на определении массы молекул вещества. «Можно сказать, что масс-спектрометрия – это «взвешивание» молекул, находящихся в пробе», – отметил **Григорий Вячеславович**.

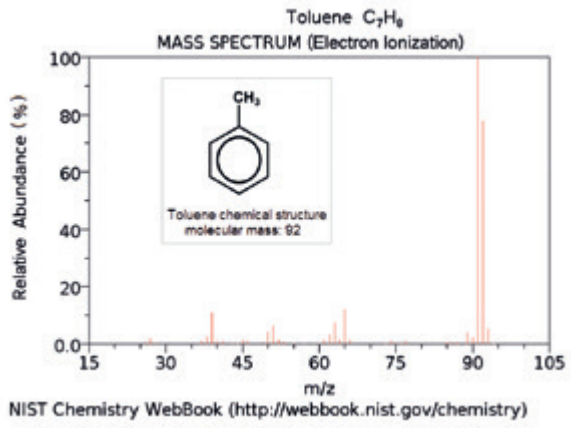


Рисунок 1. Масс-спектр

По словам представителя ведущего химико-фармацевтического холдинга ГК «Фармконтракт», сегодня все большую популярность набирает такое направление, как хромато-масс-спектрометрия. В настоящее время существуют библиотеки масс-спектров, приближающиеся по наполнению к 1 млн соединений. Хромато-масс-спектрометрия обеспечивает возможность обнаружения фемтограммовых (10^{-15} г) количеств вещества в пробе и максимальное разрешение до $2x10^6$, т.е. разделение веществ, отличающихся по массе в 5-м знаке после запятой. Данный метод является оптимальным вариантом для рутинных анализов.

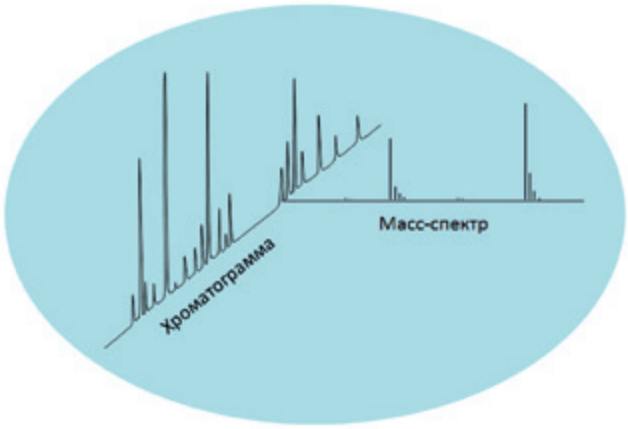


Рисунок 2. Хромато-масс-спектрометрия

Заместитель генерального директора **ООО «АЗТ Фарма К.Б.» Б.В. Бровченко** поделился с участниками семинара опытом производства и регистрации стандартных образцов в условиях отсутствия законодательной базы в фармацевтической отрасли. «Стандартные образцы играют ключевую роль в обеспечении качества на протяжении всего «жизненного цикла» лекарственного средства – начиная от его разработки и заканчивая контролем качества лекарственного средства на рынке», – убежден докладчик.

Статья 4, пункт 19.1 и пункт 19.2 Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» *с изменениями и дополнениями, вступившими в силу с 24.07.2015:*

- ***Стандартные образцы*** *– вещества, посредством сравнения с которыми осуществляется контроль качества исследуемых лекарственных средств с помощью физико-химических и биологических методов в целях подтверждения соответствия лекарственных средств требованиям нормативной документации, установленным при осуществлении государственной регистрации, и которые применяются для калибровки стандартных образцов производителя лекарственных средств, используемых для контроля качества и иных целей при обращении лекарственных средств.*
- ***Фармакопейный стандартный образец*** *– стандартный образец, произведенный в соответствии с фармакопейной статьей.*

Анализируя проблемы, с которыми сталкиваются производители лекарственных средств, **Б.В. Бровченко** отметил, что с 01.01.2016 г. вступает в силу Государственная фармакопея РФ XIII изд., где в разделе «Стандартные образцы» ОФС.1.1.001.15 «Правила пользования фармакопейными статьями» указано, что «Современные методы анализа предусматривают использование стандартных образцов. В качестве стандартных образцов в фармакопейной статье или нормативной документации должны быть предусмотрены стандартные образцы, введенные в действие уполномоченным фармакопейным органом». В руководстве по экспертизе лекарственных средств указано, что при установлении подлинности рекомендуется использование фармакопейных стандартных образцов (ГСО, ФСО, ГФУ, USP RS, EuPh CRS, BP CRS). Статус фармакопейного стандартного образца (государственная регистрация или включение в Государственный реестр фармакопейных стандартных образцов) лекарственных средств отечественного производства, не включенных в иностранные фармакопеи (EuPh, BP, USP и др.), представляет собой пробел в существующем нормативном регулировании, а именно: отсутствует порядок утверждения нормативной документации на фармакопейные стандартные образцы и включения их в Государственный реестр лекарственных средств. На сегодняшний день существует практика использования стандартного образца для оценки качества лекарственных средств, выпущенного в рамках стандарта предприятия, в том числе и для процедуры государственной регистрации лекарственных средств. В связи с этим российский производитель ищет способы регистрации стандартного образца в других отраслях.





Б.В. Бровченко привел пример аттестации методики самого стандартного образца. При проведении аттестации методики стандартного образца рекомендуется придерживаться следующей очередности мероприятий:

1. Работы при аттестации методики измерений

1.1. Выбор и отбор материала (вещества) для проведения экспериментальных исследований;

1.2. Набор экспериментальных исследований для установления показателей прецизионности методики измерений:

а) Измерение массовой доли органических примесей в веществе;

б) Измерение массовой доли воды в веществе;

в) Измерение массовой доли элементов-примесей в веществе (если значимое количество);

г) Расчет массовой доли основного вещества по полученным результатам измерений.

1.3. Расчет характеристик погрешности методики измерений с расчетом:

– показателя повторяемости (абсолютное среднеквадратическое отклонение повторяемости);

– показателя внутрилабораторной прецизионности (абсолютное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности);

– показателя правильности (границы абсолютной неисключенной систематической погрешности при доверительной вероятности P=0,95);

– показателя точности (границы абсолютной погрешности при доверительной вероятности P=0,95).

1.4. Оформление методики измерений с учетом положений ГОСТ Р 8.563-2009;

1.5. Аттестация методики измерений в аккредитованной на это право организации (ФГУП УНИИМ), получение свидетельства об аттестации методики измерений.

2. Разработка и определение метрологических характеристик

2.1. Оформление технического задания на стандартный образец;

2.2. Оформление программы испытаний на стандартный образец в целях утверждения типа;

2.3. Набор экспериментальных исследований для определения однородности материала стандартного образца;

2.4. Определение аттестованного значения стандартного образца;

2.5. Определение стабильности стандартного образца:

– метод ускоренного старения;

– метод определения стабильности в естественных условиях.

2.7. Оформление отчета о разработке стандартного образца;

2.8. Оформление акта испытаний и протокола испытаний стандартного образца;

2.9. Оформление паспорта на выпущенную партию стандартного образца (по ГОСТ Р 8.691);

2.10. Оформление проекта описания типа стандартного образца (приказ Минпромторга России от 03.02.2015 № 164).

По итогам проведенных мероприятий формируется пакет документов, подаваемый в Росстандарт для утверждения типа стандартного образца (получение свидетельства).

Подробно практические аспекты производства готовых лекарственных форм раскрыл руководитель отдела готовых лекарственных форм **ООО «Фармконтракт» А.М. Гринченко**. В своем докладе спикер представил возможности по оснащению производственных участков фармпредприятий, выпускающих твердые и мягкие лекарственные формы, мягкие желатиновые капсулы, жидкие нестерильные и стерильные лекарственные формы: от создания технологической линии как высокой, так и низкой производительности до процесса нанесения покрытия и фасовки произведенного продукта.

По традиции участникам семинара организаторы приготовили приятный подарок – анонс готовящегося к выпуску практического пособия «*Красная» биотехнология: от науки к промышленности*».

ОБЗОР ОСНОВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРАВИЛАХ ГОСУДАРСТВЕННОЙ РЕГИСТРАЦИИ ЦЕН НА ЖИЗНЕННО НЕОБХОДИМЫЕ И ВАЖНЕЙШИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ

А.Г. Одабашян[1]*, А.С. Морозова[1]

1 – ООО «ПвК Юридические Услуги» 190000, Россия, г. Санкт-Петербург, пер. Гривцова, д. 4-А, Бизнес-центр «Боллоев»

1 – LLC PricewaterhouseCoopers Legal, Office building «Bolloev Center», 4-A, Grivtsova lane, St. Petersburg, 190000, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: andrey.odabashian@ru.pwc.com
Тел.: 8 (812) 326 66 93

Резюме. В статье представлен анализ наиболее значимых изменений, вступивших в силу в октябре 2015 г., в сфере ценообразования на лекарственные препараты, включенные в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП).

Ключевые слова: ЖНВЛП, предельные отпускные цены, ценовое регулирование, ФАС.

OVERVIEW OF THE KEY AMENDMENTS TO THE RULES OF THE STATE REGISTRATION OF MAXIMUM SELLING PRICES FOR MEDICINES INCLUDED INTO THE LIST OF ESSENTIAL AND VITALLY IMPORTANT PRODUCTS

A.G. Odabashian[1]*, A.S. Morozova[1]

Abstract. In this article we analyse key amendments that came into force as of October 2015 in the sphere of the price regulation for medicines included into the list of essential and vitally important products.

Keywords: EDL medicines, maximum selling prices, price regulations, Federal Antimonopoly Service.



А.Г. Одабашян



А.С. Морозова

ВВЕДЕНИЕ

Начиная с 01 октября 2015 г. предельные отпускные цены на лекарственные препараты (ЛП), включенные в перечень жизненно необходимых и важнейших ЛП (ЖНВЛП), регистрируются по новым правилам. Вступившим в силу постановлением Правительства РФ от 15 сентября 2015 г. № 979 [1] (Постановление), был внесен ряд существенных изменений в ранее применимые правила государственной регистрации предельных отпускных цен.

Постановлением предусматриваются практически равные права российских производителей ЛП и производителей из других государств-членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС).

Помимо этого, введенным регулированием впервые законодательно закреплены правила перерегистрации предельных отпускных цен на ЛП иностранных производителей, а также предусмотрено применение понижающих коэффициентов для воспроизведенных и биоаналоговых (биоподобных) ЛП.

Более подробная информация об этих и многих других изменениях ценового регулирования приведена нами ниже.

КЛЮЧЕВЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЦЕНОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ ЖНВЛП

Изменен круг лиц, которые вправе выступать в качестве заявителя при регистрации (перерегистрации) цен на ЖНВЛП

Согласно введенным изменениям документы на регистрацию (перерегистрацию) цен на ЛП представляются не производителем, как это было предусмотрено ранее, а держателем или владельцем регистрационного удостоверения (ли-

ЭКСПЕРТНОЕ МНЕНИЕ

бо уполномоченным им лицом). При этом ранее регистрирующие органы требовали от заявителя подтвердить наличие полномочий на предоставление документов от держателя или владельца регистрационного удостоверения на практике, но такое требование не вытекало из правовых норм.

Производители из Белоруссии, Казахстана, Армении и Киргизии наделены практически таким же объемом прав в сфере ценового регулирования, что и российские производители

Начиная с 01 октября 2015 г. российские производители и производители из других государств-членов ЕАЭС (далее в совокупности – локальные производители) обладают практически равными правами при государственной регистрации и перерегистрации. Такое положение может ставить производителей из государств-членов ЕАЭС (иных, чем Россия) в более выгодные условия по сравнению с другими иностранными производителями с точки зрения возможности регистрации более высокой цены на ЛП.

В целом, процедура регистрации цен на ЛП, предусмотренная Постановлением, совпадает для российских производителей и производителей из других государств-членов ЕАЭС. Вместе с тем производители государств-членов ЕАЭС, планирующие осуществлять в России только первичную и (или) вторичную упаковку, при регистрации цен на ЛП обязаны дополнительно предоставлять сведения о минимальной отпускной цене производителя на такой ЛП в референтных странах (такая минимальная цена не может быть превышена). При этом при размещении в России полного цикла производства ЛП (а не только его упаковочных стадий) предоставление сведений о минимальных отпускных ценах производителя в референтных странах не требуется.

Предполагается, что такое положение должно стимулировать производителей к локализации в России полного цикла производства.

Вместе с тем предоставление сведений о ценах в референтных странах также не требуется и в отношении ЛП, полный цикл производства которых расположен в странах ЕАЭС иных, чем Россия.

Таким образом, с точки зрения возможности регистрации более высокой цены на ЛП, производителям становится выгоднее локализовать полный цикл производства ЖНВЛП в странах ЕАЭС иных, чем Россия, избегая теста на сравнение с минимальными отпускными ценами в референтных странах, чем осуществлять в России исключительно первичную и (или) вторичную упаковку.

Предусмотрены правила перерегистрации предельных отпускных цен на ЛП иностранного производства

Несмотря на то, что правовые нормы, позволяющие всем производителям (в том числе с июля 2015 г. – и иностранным производителям) перерегистрировать предельные отпускные цены на ЖНВЛП, и ранее были предусмотрены федеральным законодательством [2], на подзаконном уровне основания и порядок осуществления перерегистрации ЛП иностранного производства установлены не были и, соответственно, фактически иностранные производители были лишены такой возможности. С введением в действие Постановления данный пробел был восполнен. Однако соответствующие нормы Постановления сформулированы таким образом, что возможность перерегистрации цен на ЖНВЛП у иностранных производителей существенно ограничена.

Согласно Постановлению перерегистрация цен на иностранный ЛП возможна лишь в том случае, если рост курса национальной валюты государства иностранного производителя по отношению к рублю за период со дня последней регистрации (или последней перерегистрации) цены превысил прогнозируемый в России уровень инфляции. Соответственно, возникновение у иностранного производителя права на перерегистрацию цены поставлено в зависимость от состояния национальной валюты страны производства такого ЛП. По мнению специалистов Федеральной антимонопольной службы РФ (ФАС РФ), такое положение лишает возможности индексировать цены на ЛП производителям, расположенным в странах со слабой валютой (например, украинская гривна) [3, 4].

Помимо указанного требования, предлагаемая для перерегистрации предельная отпускная цена на ЛП иностранного производства не может превышать минимальную отпускную цену производителя на такой ЛП в референтных странах, что также ограничивает возможность увеличить зарегистрированные цены в России производителям, поставляющим ЛП на территорию стран с низким уровнем цен.

При этом специалисты ФАС РФ неоднократно указывали, что при подготовке поправок к существующему ценовому регулированию планируется переработать действующий перечень референтных стран и включить в него страны, близкие по экономическому развитию к России [4]. По мнению специалистов ФАС РФ, «в качестве референтных стран следует назначать те государства, которые подходят с точки зрения экономических показателей. Таким параметрам соответствуют страны БРИКС и Восточной Европы» [5]. В зависимости от конкретных изменений перечня референтных стран потенциально такие изменения могут дополнительно ограничить возможность перерегистрации цен на иностранные ЛП.

Согласно Постановлению зарегистрированная цена может быть увеличена не более чем на разницу двух величин: прогнозируемого в России уровня инфляции и разницы (выраженной в процентах) между зарегистрированной ценой и средневзвешенной фактической ценой импорта. Таким образом, импорт ЛП по ценам ниже зарегистрированных может отрицательно сказаться не только на возможности, но и на уровне последующей перерегистрации цен.

В дополнение к рассмотренным выше изменениям правил перерегистрации цен на иностранные ЛП важно также отметить, что иностранные производители вправе перерегистрировать цены на ЛП только в пределах прогнозируемого уровня инфляции. В отличие от локальных производителей возможность перерегистрации цены иностранного производителя по иным основаниям, в частности в связи с изменением цен на сырье и материалы или увеличением накладных расходов, Постановлением не предусмотрена.

Необходимо также отметить, что, по экспертной оценке Ассоциации международных фармацевтических производителей, в среднем в рамках действующего регулирования перерегистрация цен на ЛП иностранного производства возможна только на крайне ограниченное количество ЛП – 2,5%, если цены на ЛП зарегистрированы в 2010 г. [6].

Расширен перечень оснований для перерегистрации предельных отпускных цен на ЛП, произведенные на территории ЕАЭС

До вступления Постановления в силу локальные производители были вправе перерегистрировать цены вследствие изменения стоимости сырья и материалов, а также накладных расходов. В дополнение к этому Постановлением также предусмотрена возможность перерегистрации цен на ЛП нижнесреднего ценового сегмента (до 500 рублей включительно), произведенные в ЕАЭС, в случае увеличения цен на сырье и материалы, используемые при производстве ЛП, а также увеличения накладных расходов, *которое в равной мере влияет на все зарегистрированные цены на ЛП, отнесенные к одному международному непатентованному наименованию* (МНН). Как мы понимаем, к изменению таких накладных расходов могут привести, например, колебания валютных курсов, повышение ставок налогов, рост тарифов на электроэнергию и т.д. В сравнении с иными основаниями перерегистрации цен размер возможного увеличения цены в рассматриваемом случае значительно выше, поскольку позволяет увеличить зарегистрированную цену с учетом как прогнозируемого уровня инфляции на текущий год, так и уровня фактической инфляции предшествующего календарного года (то есть цены могут быть увеличены на процент, превышающий прогнозируемый уровень инфляции текущего года).

Вместе с тем, как мы понимаем, на практике перерегистрация цен по данному основанию может оказаться проблематичной, поскольку заявителям потребуется доказать соблюдение условия о **равном влиянии** увеличения расходов на **все** цены на ЛП под одним МНН. Данный вывод, в частности, подтверждается выступлением начальника управления контроля социальной сферы и торговли ФАС РФ Т.В. Нижегородцева на VII Международной конференции «Что происходит на фармацевтическом рынке?». В ходе конференции он отметил: «... применить нормы, связанные с одинаковым воздействием издержек, будет невозможно, так как увеличение цены не может действовать на всех одинаково. Для определенных производителей, увеличение издержек смертельно, а для других ограничивается лишь уменьшением доходов» [5].

При перерегистрации вследствие изменения цен на сырье и материалы, накладных расходов (независимо от ценового сегмента ЛП) напрямую не учитывается, осуществлялись ли производителем фактические продажи ЛП на уровне зарегистрированной цены либо ниже ее, но учитывается критерий рентабельности: ее уровень не должен превышать 30%. Стоит отметить, что, по имеющимся у нас данным, уровень рентабельности и ранее учитывался регистрирующими органами в процессе согласования цены на ЖНВЛП, так что его введение не должно кардинально повлиять на критерии определения цен, представляемых на перерегистрацию.

При рассмотрении других изменений, внесенных Постановлением в ранее действующие правила перерегистрации цен на ЛП локальных производителей, следует особо подчеркнуть возросшее значение средневзвешенной фактической отпускной цены на ЛП при осуществлении перерегистрации цен, связанной с инфляцией. В частности, Постановлением установлено, что зарегистрированная цена на ЛП увеличивается не более чем на разницу двух величин: прогнозируемого в России уровня инфляции и разницы (выраженной в процентах) между зарегистрированной ценой и средневзвешенной фактической отпускной ценой производителя.

Введение понижающих коэффициентов при расчете цен на воспроизведенные и биоаналоговые (биоподобные) ЛП, а также на иностранные ЛП

В соответствии с Постановлением расчет предельных отпускных цен на воспроизведенные ЛП, независимо от места их производства, осуществляется путем применения понижающего коэффициента к средней зарегистрированной предельной отпускной цене на соответствующий референтный ЛП (за трехлетний период) либо к максимальной зарегистрированной предельной отпускной цене на аналогичный ЛП в случае отсутствия референтного ЛП. Цена, регистрируемая

на воспроизведенный ЛП, не должна превышать **80%** от указанных цен на референтный или аналогичный ЛП, в то время как на биоаналоговый (биоподобный) ЛП регистрируемая цена должна быть не выше **90%** от указанных цен.

В отношении ЛП иностранного производства в дополнение к указанным ограничениям также установлено, что предельная отпускная цена на второй и последующие воспроизведенные или биоаналоговые (биоподобные) ЛП должна быть на **5%** ниже последней зарегистрированной предельной отпускной цены на аналогичный ЛП. Данное требование о пятипроцентном понижении сохраняется до тех пор, пока цена на такой иностранный ЛП не достигнет **60%** от максимальной зарегистрированной цены на референтный ЛП, а в случае его отсутствия – на аналогичный ЛП.

Предполагалось, что введение специального коэффициента для иностранных ЛП позволит обеспечить систематическое снижение цены на каждый последующий воспроизведенный или биоаналоговый (биоподобный) ЛП иностранного производства. Вместе с тем такое снижение не всегда представляется возможным поскольку последняя зарегистрированная цена на аналогичный ЛП не всегда является самой низкой. С учетом этого, как мы понимаем, разрабатываемые ФАС РФ поправки в области ценового регулирования могут изменить базу для применения 5% снижающего коэффициента с последней зарегистрированной цены на цену референтного ЛП [5].

Установлена возможность отмены государственной регистрации цены на ЖНВЛП в случае выявления недостоверности предоставленных сведений

В отличие от ранее действующих норм, с 01 октября 2015 г. предоставление заявителем недостоверных документов и (или) сведений, повлиявших на уровень зарегистрированной цены, может служить основанием для последующей отмены такой ценовой регистрации и исключения соответствующих сведений о государственной регистрации из реестра предельных отпускных цен. Ранее такая возможность у регистрирующих органов отсутствовала, в связи с чем предоставление заявителем отдельных некорректных данных в случае успешной регистрации не создавало для него существенных рисков.

Предусмотрены отдельные ограничения, препятствующие необоснованному увеличению цен на ЛП

Постановление предусматривает, что если по заявлению держателя или владельца регистрационного удостоверения сведения о зарегистрированной отпускной цене были исключены из государственного реестра цен на ЖНВЛП, то такое лицо до истечения трех лет со дня исключения сведений из реестра не вправе при повторной регистрации заявлять предельную отпускную цену на данный ЛП, превышающую ранее исключенную.

Помимо этого, с целью сокращения количества зарегистрированных цен в отношении ЛП, характеристики которых отличаются несущественно, Постановлением предусмотрено, что при изменении таких данных, как наименование ЛП, лекарственная форма или дозировка, а также при изменении держателя или владельца регистрационного удостоверения на ЛП, производителя, наименования производственных площадок, штрихового кода и ряда иных сведений, предусмотренных Постановлением, соответствующие изменения вносятся в реестровую запись о государственной регистрации в заявительном порядке – без дополнительного согласования с ФАС РФ. При этом последняя зарегистрированная цена на ЛП остается неизменной и не может быть увеличена. До введения в действие рассматриваемого положения изменение некоторых из указанных данных могло позволить производителям зарегистрировать новые цены, превышающие ранее зарегистрированные.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ПРАВОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ ЦЕНООБРАЗОВАНИЯ НА ЖНВЛП

Постановление было разработано еще до упразднения Федеральной службы по тарифам (21 июля 2015 г.) и передачи всех ее функций в сфере ценового регулирования ФАС РФ. При этом, как мы отмечали ранее, по ряду аспектов правила ценового регулирования в рамках Постановления, по мнению ФАС РФ, требуют переработки. С учетом этого Правительство РФ поручило ФАС РФ представить свои предложения об изменении введенного регулирования.

В настоящее время такие предложения находятся на стадии разработки и согласования, и существует высокая вероятность того, что в ближайшее время проект соответствующих изменений может быть принят.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение отметим, что введенные Постановлением изменения в правилах государственной регистрации цен на ЖНВЛП связаны с рядом вопросов, над которыми стоит поразмыслить всем участникам фармацевтического рынка, прежде всего производителям и дистрибьюторам. Принятие тех или иных решений следует осуществлять исходя из комплексного анализа нормативных документов, как принятых, так и проектов. Всем участниках обращения лекарств следует на постоянной основе отслеживать соответствующие изменения ценового регулирования. Такой под-

ход требует времени и ресурсов, однако он позволит участникам рынка избежать ошибок и минимизировать соответствующие риски.

ЛИТЕРАТУРА

1. Постановление Правительства РФ от 15 сентября 2015 г. № 979 «О внесении изменений в постановление Правительства Российской Федерации от 29 октября 2010 г. № 865 и об утверждении методики расчета устанавливаемых производителями лекарственных препаратов предельных отпускных цен на лекарственные препараты, включенные в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, при их государственной регистрации и перерегистрации».
2. Федеральный закон от 08 марта 2015 г. № 34-ФЗ «О внесении изменений в статью 61 Федерального закона «Об обращении лекарственных средств».
3. Оптимизация контроля за ценами в розничном ритейле в условиях кризиса: Презентация заместителя начальника управления контроля социальной сферы и торговли ФАС РФ Н.А. Шаравской на Международном деловом медико-фармацевтическом форуме. 7 декабря 2015. URL: https://www.aptekaexpo.ru/files/2015/forum/7dec/1/Sharovskaja_N.pdf (дата обращения 10.12.2015).
4. Презентация начальника управления контроля социальной сферы и торговли ФАС РФ Т.В. Нижегородцева на заседании экспертного совета при ФАС РФ по развитию конкуренции в социальной сфере и здравоохранении от 19 октября 2015 г. URL: http://fas.gov.ru/netcat_files/File/Prezentatsiya%20po%20novoy%20metodike%20na%20ES%20(Nizhegorodtsev).pdf (дата обращения 25.10.2015).
5. Официальный сайт ФАС РФ: статья «В России изменится методика регулирования цен на лекарства» URL: http://fas.gov.ru/press-center/fas-in-media/detail.html?id=18010 (дата обращения 20.01.2016).

Презентация директора по регуляторным вопросам и политике в области здравоохранения Ассоциации международных фармацевтических производителей (AIMP) Е.Ю. Поповой на заседании экспертного совета при ФАС РФ по развитию конкуренции в социальной сфере и здравоохранении от 19 октября 2015 г. URL: http://fas.gov.ru/netcat_files/File/tsenoobrazovanie-1.pdf (дата обращения 25.10.2015).

V ФОРУМ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ УПАКОВКИ

«ФАРМАПАК»

Участие для фармацевтических и косметических производителей бесплатное!

26 мая 2016 года, Москва
Конгресс-центр Технополис

Рассмотрение нормативно-правовых изменений, касающихся требований к инструкциям-вкладышам лекарственных препаратов и упаковке

Обсуждение вопросов, связанных с повышением эффективности процесса фасовки лекарств и косметики

Построение диалога между фармацевтическими компаниями и производителями упаковки с целью сделать производство конечного продукта ЛУЧШЕ, БЫСТРЕЕ И ДЕШЕВЛЕ!

За подробной информацией обращайтесь:
тел.(831) 461-89-80 (доб.164)

e-mail: zaikina_a@promis.ru
upak-forum.ru



X НАЦИОНАЛЬНЫЙ КОНГРЕСС С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«РАЗВИТИЕ ФАРМАКОЭКОНОМИКИ И ФАРМАКОЭПИДЕМИОЛОГИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ» — «ФАРМАКОЭКОНОМИКА–2016»

Нижний Новгород
Маринс Парк Отель

4–5 апреля 2016 г.

ФАРМАКО
ЭКОНОМИКА
ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

В ПРОГРАММЕ КОНГРЕССА

Пленарное заседание

- Фармакоэкономика и оценка технологий здравоохранения: фокус на региональное развитие

Специализированные сессии

- Фармакоэкономика сахарного диабета
- Фармакоэкономика в онкологии
- Фармакоэкономика вирусных гепатитов
- Фармакоэкономика в неврологии
- Фармакоэкономика в нефрологии
- Фармакоэкономика в кардиологии
- Фармакоэкономика ВИЧ
- Фармакоэкономика в онкогематологии
- Использование результатов фармакоэкономического анализа на уровне ЛПУ (для главных врачей)

Образовательные семинары – «Лекция в рабочий полдень»

- Основы фармакоэкономического анализа для практического врача
- Фармакоэкономическое моделирование: возможности получения данных на уровне региона и страны в целом

Презентация книги «Лекарственное обеспечение и фармакоэкономика сахарного диабета» (второе издание, переработанное)

Подведение итогов Конкурса молодых исследователей по фармакоэкономике на лучшую научную работу 2016 года

Первая премия — публикация полной научной статьи с переводом на английский язык в журнале «Фармакоэкономика: теория и практика» в 2016 году с размещением на сайте журнала www.pharmacoeconom.com
Вторая премия — бесплатная аккредитация с публикацией тезисов на следующий XI конгресс «Развитие фармакоэкономики и фармакоэпидемиологии» в 2017 году
Третья премия — бесплатная подписка на 2016 год на печатный вариант журнала «Фармакоэкономика: теория и практика» по каталогу «Почта России», подписной индекс 92646

Данный Конгресс является уникальным специализированным мероприятием с участием ведущих отечественных и зарубежных специалистов. Это практическая площадка для обмена мнениями профессионалов в области фармакоэкономики и организаторов здравоохранения по практическому использованию полученных результатов последних фармакоэкономических исследований с выбором оптимальной стратегии финансирования.

Дополнительная информация на сайте www.fru.ru
и по тел.: (495) 359-06-42, 359-53-38, e-mail: fru@fru.ru

Обращаем Ваше внимание, что Оргкомитет конгресса оставляет за собой право вносить изменения в программу и состав докладчиков

УДК 615.45

ТЕХНОЛОГИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ ТАБЛЕТОК КИСЛОТЫ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ

А.В. Симонян[1]*, А.А. Саламатов[1], М.А. Симонян[2], А.Н. Кожанова[1], Н.О. Марайкина[1], Ю.А. Попова[1]

1 – ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра фармацевтической технологи и биотехнологии, 400001, Россия, г. Волгоград, ул. КИМ, 20

2 – Муниципальная аптека № 38, 400131, Россия, г. Волгоград. Аллея Героев, 5

1 – State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Volgograd State Medical University» of the Ministry of health of the Russian Federation, Department of pharmaceutical technology and biotechnology, 20, KIM str., Volgograd, 400001, Russia

2 – Municipal Pharmacy № 38, 5, Avenue of Heroes, Volgograd, 400131, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: avsimonyan@yandex.ru
Тел.: 8 (8442) 97 50 66

Резюме. Разработана комбинированная лекарственная форма – таблетки, содержащие по 0,25 г кислоты ацетилсалициловой и 0,1 г циквалона, соответствующие требованиям ГФ XII и ГФ XIII. Добавление циквалона дает возможность приготовить таблетки при низком давлении прессования, что позволит снизить трудо- и энергозатраты производства таблеток и увеличить срок службы пресс-инструмента.

Ключевые слова: кислота ацетилсалициловая, циквалон, комбинированные таблетки.

COMBINED ACETYLSALICYLIC ACID TABLETS TECHNOLOGY

A.V. Simonyan[1]*, A.A. Salamatov[1], M.A. Simonyan[2], A.N. Kozhanova[1], N.O. Maraikina[1], J.S. Popova[1]

Abstract. It was developed combined dosage form – tablets, each containing 0,25 g of acetylsalicylic acid and 0,1 g of cycvalon that meet the requirements of the State Pharmacopeia XII and State Pharmacopeia XIII. Addition of cycvalon allows to prepare tablets at a low pressure, which will reduce labor, energy costs of manufacture of tablets and to increase the service life of the press tool.

Keywords: acetylsalicylic acid, cycvalon, combined tablets.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка технологии эффективных и практически нетоксичных лекарственных средств (ЛС) и лекарственных форм (ЛФ) на их основе является актуальной проблемой современного здравоохранения.

Кислота ацетилсалициловая (КАС) применяется в медицине в качестве противовоспалительного, жаропонижающего, анальгетического и антиагрегантного средства. Однако при ее применении наблюдаются нежелательные побочные явления: ульцерогенное действие, нарушение функции кроветворения и гепато-биллиарной системы. В настоящее время в медицинской практике широко используют различные ЛФ КАС (таблетки: обычные, шипучие, кишечно-растворимые, а также микрокапсулы). Несмотря на многообразие ЛФ КАС, до настоящего времени проблема, связанная с проявлением ее нежелательных явлений, не решена [1–3].

В связи с этим одной из актуальных задач здравоохранения является разработка технологии комбинированных ЛФ, позволяющих существенно снизить выраженность нежелательных побочных явлений КАС и улучшить технологические характеристики таблеток на ее основе.

Перспективным направлением в разработке комбинированных ЛФ является использование известного желчегонного средства, циквалона, в качестве безопасного дополнительного вспомогательного вещества (ВВ). Кроме того, нами установлено, что циквалон обладает широким спектром фармакологической активности: антиоксидантным, антирадикальным, антиаллергическим, противовоспалительным, гастро-, гепато-, нефро-, церебро-, цитопротекторным и улучшающим мозговое кровообращение действием, при этом циквалон не обладает нежелательными побочными явлениями, а в используемых дозах не имеет противопоказаний. Циквалон относится к практически нетоксичным соединениям, так как значение его LD_{50} определить практически невозможно, а введение максимально возможной дозы (5000 мг/кг) не вызывает гибели животных и их интоксикации [4–7]. Результаты исследований на моделях индометацинового и этанолового язвообразования в опытах *in vivo* (крысы) свидетельствуют о том, что циквалон характеризуется выраженным гастропротекторным действием, практически не уступая известному ЛС мизопростолу, но выгодно отличаясь от последнего отсутствием нежелательных побочных явлений [5].

На основании всего вышеизложенного и с учетом единого механизма развития ульцерогенного действия под влиянием нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) мы предположили, что циквалон в комбинации с НПВС в качестве ВВ может оказать и защитное действие на ор-

ганизм, снизить выраженность нежелательных побочных явлений, вызываемых НПВС.

Целью настоящих исследований является разработка технологии комбинированной ЛФ КАС с циквалоном в форме таблеток и исследование технологических характеристик целевого продукта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами для исследований служат субстанции КАС и циквалона [1, 4]. Циквалон синтезирован А.В. Симоняном и соответствует ФС 42–1158–86. Кроме того, материалами для исследований служат таблетки КАС различных производителей по 0,5 г:

1. ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов» (Беларусь);
2. ЗАО «Медисорб» (Россия);
3. ЗАО «Производственная фармацевтическая компания «Обновление» (Россия);
4. таблетки КАС по 0,1 г «Тромбо АСС», покрытые пленочной кишечнорастворимой оболочкой («Ланнахер Хайльмиттель ГмбХ», Шпоссплатц, Австрия).

Для проведения анализов нами использованы следующие реактивы и ВВ:

Реактивы

1. Кислота хлороводородная, х.ч., ГОСТ 3118-77: ООО «Компонент-Реактив» (Россия).
2. Натрия гидрокарбонат, ч., ГОСТ 2156-76: ОАО «Башкирская содовая компания» (Россия).
3. Спирт этиловый 96%, ректификат, ГОСТ 5962-67.
4. Вода очищенная, ФС 42-0324-09.
5. Кислота ледяная уксусная, х.ч., ГОСТ 61-75: ООО «Компонент-Реактив» (Россия).
6. Натрия гидроксид, ч.д.а., ГОСТ 4328-77: ООО «Компонент-Реактив» (Россия).
7. Квасцы железоаммонийные 12-водные, х.ч., ГОСТ 4205-77: ООО «ТАТХИМПРОМ» (Россия).
8. Кислота салициловая, ГОСТ 624-70: ОАО «Фармстандарт» (Россия).

Вспомогательные вещества

1. Крахмал растворимый, ГОСТ 10163-76, в/сорт: ООО «Порецкий крахмальный завод» (Россия).
2. Тальк молотый, ТУ 21-25-161-75 ТМО: ОАО «Шабровский тальковый комбинат» (Россия)
3. Кальция стеарат, ТУ 2432-061-56856807-04: НПО «Химресурс» (Украина).
4. Целлюлоза микрокристаллическая (ЦМК), ТУ 9199-001-07508109: ООО «БиАлт» (Россия).
5. Лудипресс, НД 42-8803-05,2005: BASF (Германия).

Все таблетки приготовлены методом прямого прессования. Составы таблеток указаны в таблицах 1 и 3.

Оценка качества ЛФ осуществлена в соответствии с ГФ XII и ГФ XIII. Для количественного определения КАС, циквалона и свободной кислоты салициловой в таблетках использованы методики УФ-спектрофотометрии [1, 4, 7].

Методика количественного определения КАС. Около 0,2 г (точная навеска) порошка из 20 растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют около 400 мл ацетатного буферного раствора со значением pH 4,5 до растворения КАС, перемешивают и доводят объем ацетатным буферным раствором до метки. При этом в осадке остается циквалон, нерастворимый в кислой среде, и ВВ, входящие в состав таблетки. Полученную суспензию фильтруют через стеклянный фильтр № 1, отбрасывая первые порции фильтрата.

Определение содержания КАС в таблетке проводят по оптической плотности приготовленного раствора, как описано в ФС [1].

Методика количественного определения циквалона. После отделения КАС осадок на стеклянном фильтре № 1 сушат до постоянной массы. Содержание циквалона определяют по методике, описанной в информационном письме [7].

Методика количественного определения свободной кислоты салициловой в таблетках на основе КАС и циквалона.

Подготовка испытуемого раствора. Около 0,4 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 10 мл 96% этанола, перемешивают 2 мин, прибавляют 2 мл 0,2% раствора квасцов железоаммониевых, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через стеклянный фильтр № 1, отбрасывая первые порции фильтрата.

В качестве стандартного образца использована кислота салициловая, которая получена трехкратной кристаллизацией фармакопейной субстанции из воды.

Раствор стандартного образца. Около 0,06 г (точная навеска) стандартного образца кислоты салициловой, приготовленного как описано выше, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 96% этаноле, доводят объем раствора 96% этанолом до метки и перемешивают. К 1 мл полученного раствора добавляют 39 мл 96% этанола, 4 мл 0,2% раствора железоаммониевых квасцов и доводят водой до 100 мл.

Измерение оптической плотности раствора стандартного образца проводят при длине волны 540 нм относительно 96% этанола.

Оптическую плотность исследуемого образца определяют при длине волны 540 нм относительно раствора сравнения, в котором в качестве исходной субстанции приготовлена модельная смесь без добавления КАС, содержащая циквалона – 0,1 г, крахмала – 0,03 г, талька – 0,01 г и кальция стеарата – 0,004 г.

Для анализа используют свежеприготовленные растворы.

Перечень оборудования, используемого в работе

1. Аналитические весы ВСЛ-60/0,1А: ООО «Аналит-Нева» (Санкт-Петербург, Россия).
2. Спектрофотометр СФ-56: ООО «ЛОМО-Спектр» (С.-Петербург, Россия).
3. Пресс таблеточный лабораторный с прогрессивным давлением, произведенный по проекту А.В. Симоняна Волгоградским заводом медицинского оборудования (Россия).
4. Прибор контроля истираемости таблеток серии TAR: ERWEKA GmbH (Германия).
5. Прибор контроля прочности таблеток на раздавливание серии TBH 325: ERWEKA GmbH (Германия).
6. Тестер распадаемости серии ZT 220: ERWEKA GmbH (Германия).
7. Тестер растворения DT 126 light: ERWEKA GmbH (Германия).

Тестер истираемости / ломкости таблеток ERWEKA TAR 220





Тестер распадаемости ERWEKA ZT 220

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе проведены исследования по разработке технологии таблеток КАС с циквалоном. При этом состав используемых ВВ в таблетках КАС, приготовленных в соответствии с ФС 42-3254-95, не менялся.

Для сравнения приготовлены таблетки КАС аналогичного состава, но с добавлением вместо циквалона целлюлозы микрокристаллической (ЦМК) и лудипресса в качестве высокоэффективных связующих ВВ [8].

КАС легко подвергается гидролизу, поэтому для приготовления таблеток использовали метод прямого прессования, а образцы всех ВВ сушили до достижения постоянной массы: ЦМК, тальк и циквалон – при температуре 105–110 °С, кальция стеарат – при 80–90 °С, крахмал – при 50–60 °С, лудипресс – при 40 °С [8, 9].

Составы приготовленных таблеток приведены в таблице 1.

На основании проведенных исследований установлен оптимальный состав таблеток: КАС – 0,25 г, циквалона – 0,1 г, крахмала – 0,03 г, талька – 0,01 г, кальция стеарата – 0,004 г. Следует отметить, что после введения в порошковую смесь циквалона она приобретает хорошую сыпучесть (>8,5 г/с), что обеспечивает точность дозирования при таблетировании. Таким образом, установлено, что циквалон в комбинации с КАС выступает как связующее вещество. Это обеспечивает получение таблеток надлежащего качества с прочностью на раздавливание более 68 Н при диаметре ЛФ 10 мм на относительно низких давлениях прессования – 10,35 МПа. Таблетки данного состава по всем показателям соответствуют требованиям ГФ XII и ГФ XIII: средняя масса таблеток составляет 0,394 г, отклонения в массе отдельных таблеток не превышают 5% (±0,01 г), распадаемость – 5±1 мин (<15 мин), прочность на раздавливание – 69±0,99 Н (>40 Н), истираемость – 2,5±0,08% (<3%) [9]. В то же время таблетки КАС, приготовленные без добавления циквалона, даже при давлении более 1725 МПа имеют низкую прочность на раздавливание – менее 19 Н. В то же время согласно ГФ XII и ГФ XIII прочность таблеток на раздавливание при диаметре 10 мм должна составлять не менее 40 Н.

Таблетки КАС, приготовленные с использованием традиционных связующих ВВ – ЦМК или лудипресса, не соответствуют требованиям ГФ XII и ГФ XIII по показателю прочности даже при относительно высоких давлениях прессования – 20,7 МПа.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение циквалона в технологии таблеток КАС позволяет значительно снизить энергозатраты таблеточных машин и увеличить сроки их эксплуатации.

Дальнейшие исследования направлены на изучение влияния циквалона на технологические характеристики таблеток КАС промышленного производства.

На первом этапе нами проведена оценка качества данных таблеток в соответствии с ГФ XII (таблица 2).

Анализ результатов проведенных исследований (таблица 2) свидетельствуют о том, что эти таблетки по всем основным показателям соответствуют требованиям ГФ XII и ГФ XIII.

Таблица 1.

Технологические характеристики таблеток КАС различных составов

№ п/п	Состав на 1 таблетку, г	Рабочее давление прессования, МПа	Прочность на раздавливание, Н	Истираемость, %
1	2	3	4	5
1.	КАС, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,044:0,006:0,004)	17,25	18±0,3	24,5±1,1
2.	КАС, циквалон, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,1:0,04:0,01:0,004)	13,8	58±0,91	3,5±0,1
3.	КАС, циквалон, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,05:0,04:0,01:0,004)	13,8	40±0,78	4,5±0,15
4.	КАС, циквалон, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,1:0,03:0,01:0,004)	10,35	69±0,99	2,5±0,08
5.	КАС, циквалон, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,05:0,03:0,01:0,004)	10,35	50±1,3	2,5±0,08
6.	КАС, циквалон, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,1:0,02:0,01:0,004)	10,35	59±1,6	3,6±0,12
7.	КАС, циквалон, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,05:0,02:0,01:0,004)	10,35	60±1,8	4,7±0,15
8.	КАС, ЦМК, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,25:0,03:0,01:0,004)	20,7	37±0,74	12,2±0,37
9.	КАС, ЦМК, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,2:0,03:0,01:0,004)	20,7	28±0,52	14,6±0,44
10.	КАС, ЦМК, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,15:0,03:0,01:0,004)	20,7	29±0,64	17,4±0,51
11.	КАС, лудипресс, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,25:0,03:0,01:0,004)	20,7	49±1,6	6,9±0,21
12.	КАС, лудипресс, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,2:0,03:0,01:0,004)	20,7	47±1,8	8,3±0,25
13.	КАС, лудипресс, крахмал, тальк, кальция стеарат (0,25:0,15:0,03:0,01:0,004)	20,7	39±0,94	13,7±0,41

Таблица 2.

Технологические характеристики таблеток КАС промышленного производства

Наименование таблеток*	Средняя масса и отклонение по массе таблеток, г	Распадаемость, мин	Прочность на раздавливание, Н	Истираемость, %
Образец 1	0,599±0,029	<1	79±1,9	0,29±0,004
Образец 2	0,553±0,025	<1	88±2,2	0,59±0,009
Образец 3	0,603±0,029	<1	129±4,1	0,65±0,02
Образец 4	0,216±0,011	Не распадаются в течение 1 ч в 0,1 н растворе HCl и распадаются в течение 8±1 мин в 1,5% растворе $NaHCO_3$	157±4,9	0,07±0,003

Примечание: *нумерация образцов таблеток соответствует таковой, указанной в разделе «Методика исследований».

С учетом полученных данных о связывающей способности циквалона (таблица 1) исследовано его влияние на свойства таблеток от разных производителей по следующей схеме (таблица 3):

1 – готовые таблетки измельчают (образцы № 1–4);

2 – к каждому образцу измельченных таблеток добавляют циквалон в соотношении 0,3 г : 0,1 г соответственно;

3 – готовят модельные таблетки диаметром 10 мм при разных давлениях прессования;

4 – проводят анализ их технологических характеристик.

Как видно из полученных данных, добавление циквалона позволяет во всех случаях получить таблетки, соответствующие требованиям ГФ XII и ГФ XIII, при давлениях прессования 15,52–17,25 МПа. В то же время без добавления циквалона модельные таблетки КАС при тех же величинах давления прессования не соответствуют требованиям ГФ по показателю прочности на раздавливание и истираемость. При этом следует обратить внимание на то, что исходные таблетки КАС исследуемых образцов характеризуются высокими показателями прочности на раздавливание – более 78 Н и истираемость – менее 2% (таблица 2). Такие показатели качества таблеток достигаются при исполь-

Таблица 3.

Технологические характеристики модельных таблеток КАС, приготовленных из промышленных образцов

Приготовленные таблетки*	Рабочее давление прессования, МПа	Средняя масса таблеток и отклонение в массе отдельных таблеток, г	Распадаемость, мин**	Прочность на раздавливание, Н	Истираемость, %
Таблетки образца 1; То же с циквалоном	20,7 15,52	0,394±0,017 0,398±0,015	<1 <1	39±0,85 79±1,8	13±0,39 1,95±0,06
Таблетки образца 2; То же с циквалоном	20,7 15,52	0,391±0,012 0,394±0,018	<1 <1	50±1,4 59±1,6	11±0,25 2,65±0,04
Таблетки образца 3; То же с циквалоном	20,7 15,52	0,394±0,018 0,396±0,018	<1 <1	46±1,4 60±2,7	13±0,25 2,65±0,04
Таблетки образца 4; То же с циквалоном	20,7 17,52	0,399±0,014 0,394±0,016	<1 <1	45±1,3 58±2,6	10±0,25 2,25±0,05

Примечание: *нумерация образцов таблеток соответствует таковой, указанной в разделе «Методика исследований»;
**определение распадаемости таблеток проведено в воде очищенной.

зовании крайне высокого давления прессования, составляющего, согласно литературным данным, более 75,05 МПа [3].

Таким образом, исследовано влияние циквалона на технологические характеристики модельных таблеток, приготовленных из субстанции КАС и таблеток промышленного производства. Установлено, что использование в технологии целевого продукта циквалона в количестве 0,1 г на 0,4 г таблетируемой массы позволяет получить таблетки, соответствующие требованиям нормативной документации (НД), при относительно невысоких значениях давления прессования – не более 17,25 МПа.

На этом основании ЛС циквалон можно рекомендовать в технологии таблеток КАС в качестве безопасного эффективного связывающего вещества.

Дальнейшие исследования посвящены разработке методов количественного содержания КАС и циквалона в приготовленных комбинированных таблетках (см. таблицу 1, состав 4).

Результаты анализов приведены в таблицах 4 и 5. Установлено, что содержание КАС составляет 249,8±4,08 мг, а циквалона – 98,57±1,11 мг в 1 таблетке.

Одним из важных показателей стабильности КАС и ЛФ на ее основе является отсутствие в них свободной кислоты салициловой. Исследования показали, что содержание кислоты салициловой в свежеприготовленных таблетках, а также в ЛФ при хранении в течение 1 года (срок наблюдения) при комнатной температуре в банке светозащитного стекла, герметично укупоренной навинчиваемой крышкой, составляет 0,075±0,002 мг в 1 таблетке (P=95%). Полученные результаты соответствуют требованиям НД (не более 0,125 мг в 1 таблетке) [2].

Таблица 4.

Результаты количественного определения КАС в комбинированных таблетках КАС

№ п/п	Навеска растертых таблеток, г	D_x, λ_{max}=265 нм	Содержание АСК в 1 таблетке, мг
1	0,20050	0,47153	246,96
2	0,20190	0,47899	249,13
3	0,20080	0,47796	249,95
4	0,1930	0,46034	250,47
5	0,19990	0,47777	250,98
6	0,20010	0,47886	251,29
Статистическая обработка метода анализа		f=5; <x>=249,8 мг; s^2=2,519; s=1,587; P=95%; t(95%, 5)=2,57; Δx=4,08; ε=1,63%	

Таблица 5.

Результаты количественного определения циквалона в комбинированных таблетках КАС

№ п/п	Навеска растертых таблеток, г	D_x, λ_{max}=386 нм	Содержание циквалона в 1 таблетке, мг
1	0,20195	0,48389	97,79
2	0,20200	0,48693	98,38
3	0,20350	0,49173	98,62
4	0,20010	0,48409	98,74
5	0,20335	0,49274	98,89
6	0,20140	0,48840	98,97
Статистическая обработка метода анализа		f=5; <x>=98,57 мг; s^2=0,187; s=0,433; P= 95%; t(95%, 5)=2,57; Δx=1,11; ε=1,13%	

Таким образом, ЛС циквалон, обладающее широким спектром фармакологической активности, можно использовать и как связывающее ВВ в технологии таблеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние циквалона на показатели качества модельных таблеток, приготовленных из субстанции кислоты ацетилсалициловой и таблеток промышленного производства. Установлено, что использование в технологии целевого продукта циквалона в количестве 0,1 г на 0,4 г таблетируемой массы позволяет получить таблетки, соответствующие требованиям ГФ XII и ГФ XIII, при относительно невысоких давлениях прессования – не более 17,25 МПа. На этом основании разработаны комбинированные таблетки, содержащие по 0,25 г кислоты ацетилсалициловой и 0,1 г циквалона. Установлено, что приготовленные таблетки по всем показателям соответствуют требованиям ГФ XII и ГФ XIII и характеризуются стабильностью при хранении в течение 1 года (срок наблюдения).

Разработанная комбинированная лекарственная форма может быть использована в качестве жаропонижающего, анальгетического, противовоспалительного средства и, возможно, позволит снизить нежелательные побочные явления, связанные с приемом кислоты ацетилсалициловой и других нестероидных противовоспалительных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ацетилсалициловая кислота субстанция. ФСП 42–12535–02. 06.06.2002. Chimprod Co. Румыния.
2. П.С. Лагута, Ю.А. Карпов. Аспирин: история и современность // Русский медицинский журнал. 2012. № 25. С. 1256–1263.
3. Патент 2099058 РФ; МПК7 A61K31/616, A61K9/20, A61J3/10. Способ получения быстрорастворимой таблетированной формы ацетилсалициловой кислоты / А.В. Душкин, Н.В. Тимофеева. – № 2000104050/14; заявл. 17.02.2000.
4. ФС 42–1158–86. Циквалон: субстанция-порошок (пакеты полиэтиленовые двухслойные) 10 кг.
5. А.В. Симонян, Т.В. Агаркова, М.В. Черников. Гастропротективная активность циквалона // Фармация. 2011. № 4. С. 46–48.
6. А.В. Симонян, А.А. Аванесян, М.А. Симонян. Комбинированные лекарственные формы для лечения заболеваний, связанных с нарушением иммунного статуса // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 11 (2). С. 218–224.
7. А.В. Симонян, М.А. Симонян. Новые аспекты применения в медицинской практике желчегонного средства циквалон: Информационное письмо. – Волгоград. 2011. 50 с.
8. И.В. Воскобойникова, С.Б. Авакян, Т.А. Сокольская и др. Современные вспомогательные вещества в производстве таблеток. Использование высокомолекулярных соединений для совершенствования лекарственных форм и оптимизации технологического процесса // Хим.-фарм. журн. 2005. Т. 39. № 1. С. 22–28.
9. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII издание. – М.: Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. Т. 1. 704 с.; Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. – М. URL: http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-departamenta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakopeynyh-statey (дата обращения 20.01.2016).



Тестер растворения ERWEKA DT 126 light

УДК 615.012,
615.014,
615.07,
615.3

ПРОЕКТНО-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ПРИМЕРЕ ДЖЕНЕРИКОВОГО МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО АМОКСИЦИЛЛИН И КЛАВУЛАНОВУЮ КИСЛОТУ

Ю.В. Власенко[1]*

1 – ООО «МК Девелопмент», Россия, 121087, г. Москва, ул. Барклая, д. 6, стр. 5, оф. 632

1 – LLC «MK Development», 6/5, Barklaya str., Moscow, 121087, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: vlasenko@mc-dev.ru
Тел.: 8 (495) 269 00 16

Резюме. В ходе определения пространства разработки лекарственного препарата была создана область решений, позволяющая обособить рассматриваемый вид работ от операционной деятельности в целях достижения поставленных задач в регламентированные сроки. Представленный в данной статье подход к анализу и имплементации процессов (как разработки, так и жизненного цикла продукта в целом) отличается большой глубиной вовлеченности заинтересованных лиц и результативностью.

Ключевые слова: фармацевтическая разработка, фармацевтическая субстанция, амоксициллин, клавулановая кислота, система качества.

PROJECT-ORIENTED APPROACH TO FINISHED PHARMA PRODUCT DEVELOPMENT IN THE CONTEXT OF GENERIC POLYCOMPONENT DRUG CONTAINING AMOXYCILLIN AND CLAVULANIC ACID

Yu.V. Vlasenko[1]*

Abstract. During steps of drug development area determination the decision area was framed providing isolation observed work activities from operating activities in order to set task achievement in specified time. Represented in the present paper approach to process analysis and implementation (including product development and lifecycle) characterized high level of concerned person involvement and high efficiency.

Keywords: pharmaceutical development, pharmaceutical substance, amoxicillin, clavulanic acid, quality system.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из приоритетных задач в области здравоохранения является обеспечение качества лекарственных средств, находящихся в обращении. При этом уровень требований, предъявляемых к лекарственным средствам, определяет уровень безопасности их применения. В свою очередь, определение основных принципов обеспечения качества имеет первостепенное значение в организации производства лекарственных средств. Надлежащее функционирование системы качества производителя, основывающееся на многоступенчатой иерархии документации, является обязательным требованием, на котором акцентируется внимание регуляторных органов, регламентирующих деятельность фармацевтических предприятий.

Однако стоит особенно отметить роль фармацевтической разработки как основополагающего элемента, определяющего качество лекарственного препарата. Через определение целевого профиля продукта, включающего в себя как задаваемые параметры качества и безопасности, так и стратегию управления рисками, возможно создание уникальной методологии, направленной на реализацию задач, поставленных перед разработчиками, с применением оптимального количества ресурсов.

Учитывая уровень и темп развития фармацевтического рынка, стремление к диверсификации производства при одновременной сегментации отрасли в целом, построение системы, позволяющей разрабатывать конкурентоспособный продукт, отвечающий обозначенным требованиям, в ограниченные сроки, является важным аспектом в данной сфере. При этом использование передовых мировых практик позволяет определить наилучший путь реализации поставленных задач.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

При построении собственной системы фармацевтической разработки мы руководствовались мировым опытом, руководящими указаниями (ICH, FDA, отраслевыми стандартами), а также актуальными регуляторными требованиями [1]. Агрегирование этих знаний позволило определить основные фазы проекта, а также определить взаимосвязи подзадач, одной из основных характеристик которых является оптимизация ресурсов: материальных, человеческих, временных.

Краеугольным камнем фармацевтической разработке, как и последующего производства лекарственных препаратов, является функционирование системы качества. При этом одним из основополагающих документов в нашей компании является стандарт предприятия «Разработка лекарственного препарата», описывающий этапы, порядок действий при разработке, задействованный персонал, требования к отчетности. Определенная структура декомпозиции работ, основанная на полученном опыте, является наглядной и, что немаловажно, включает в себя сведения об установленных типовых нормативах трудовых и временных ресурсов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЕКТА ПРИМЕНИТЕЛЬНО К ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКЕ

ГОСТ Р ИСО 21500-2014 «Руководство по проектному менеджменту» (идентичен международному стандарту ISO 21500:2012 «Guidance on project management») определяет проект как уникальный набор процессов, состоящих из координируемых и контролируемых работ, регламентированных временными рамками, осуществляемых для достижения целей, которые требуют получения определенных результатов с заданными характеристиками [2]. Проект имеет определенное начало и окончание, может делиться на фазы, реализуется в определенной среде, его процессы взаимосвязаны.

Рассмотрим фармацевтическую разработку (ФР) в терминах проектной деятельности:

1. ФР представляет собой деятельность, осуществляемую в среде отрасли.
2. ФР разделена на процессы, группы работ.
3. Выполняемые работы имеют временные характеристики.
4. Целесообразно осуществлять их контроль и координацию работ ФР (в т.ч. для своевременного реагирования в случае возникновения рисков).
5. Целью ФР является получение выгоды от внедрения нового продукта.
6. Результат ФР – получение формуляции качественного и безопасного лекарственного препарата.
7. Началом ФР является принятое решение о необходимости разработки уникального продукта, окончанием – его передача в серийный выпуск.

Таким образом, показано, что фармацевтическая разработка продукта по сути своей действительно является проектом. При этом мировой опыт развития бизнеса свидетельствует, что проектная деятельность является самой эффективной и детерминированной, и именно эти аспекты стали ключевыми в определении нашего подхода.

ИМПЛЕМЕНТАЦИЯ ПРОЕКТНОГО ПОДХОДА

Типовая блок-схема проекта приведена на рисунке 1. Рассмотрим подробнее ее основные составляющие.

Этап 1. Инициация

Работа над проектом начинается с его инициации, включающей в себя обозначение области работ (молекула, нозология, лекарственная форма, степень модификации), проектных ограничений и назначение менеджера проекта с одновременным определением границ его полномочий. Менеджером проекта (МП) назначается сотрудник, имеющий достаточную компетенцию (техническую, поведенческую, контекстную) для реализации проекта и обеспечения его надлежащего руководства, осознающий сферу своей ответственности. Основными функциями МП являются: идентификация возможностей, определение стратегии, бюджета, проектной команды (на начальной стадии проекта), координация и контроль работ (на протяжении всего процесса), оценка рисков и принятие решений (в критических точках). В случае работ, осуществляемых по контракту, МП является основным связующим звеном с заказчиком.

Первоочередным для МП является создание предварительного технического задания, включающего в себя основные сведения о предмете разработки.

Этап 2. Проработка (включая планирование)

Оценка возможностей (в том числе наличия ресурсов) осуществляется МП на стадии проработки. Этап по своей сути предназначен для уточнения целесообразности разработки путем агрегирования и

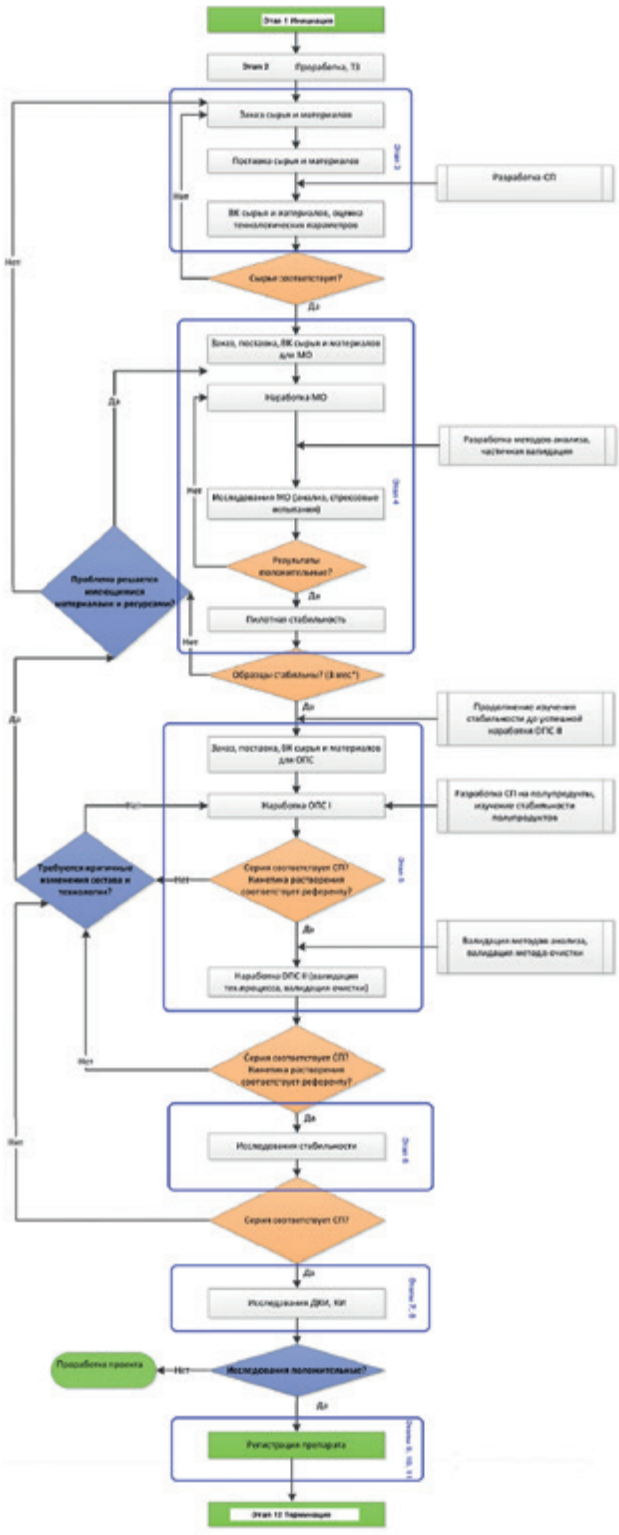


Рисунок 1. Блок-схема проекта

анализа данных о патентном статусе предполагаемого продукта, его рынке, а также осуществимости проекта. Для фармацевтических продуктов базовыми ограничениями являются технологические (оборудование, процессы) и аналитические (специфические реактивы, приборы) возможности, сырьевая база (фармацевтическая субстанция, вспомогательные вещества, упаковочные и другие материалы), наличие животных моделей для проведения необходимого объема доклинических исследований, определенных регуляторной базой, и, конечно же, финансовое обеспечение.

Информация для заключения может быть получена из открытых источников, на основании имеющегося опыта разработчиков, от заказчика (в случае контрактной разработки). Вне зависимости от пути поступления такой информации она проходит через призму критического и максимально объективного видения.

На основании проработки формируются выходные данные этапа: устав проекта, содержащий, кроме прочего, уточненное техническое задание на разработку, календарный план и бюджет. Календарный план подробно описывает последовательность подзадач, необходимых для достижения конечных целей, с распределением ресурсов, процентом их загрузки и таймингом. Бюджет включает в себя условно постоянные величины, например амортизацию оборудования, расходы на энергообеспечение, фонд оплаты труда (рассчитывается по загрузке человеческих ресурсов), а также затраты на закупку сырья, материалов, реактивов, комплектующих, оборудования, приборов и их обслуживание, услуги сторонних организаций.

По результатам проработки происходит утверждение проекта или его отклонение в случае несоответствия параметров разработки принятым ограничениям (временным, финансовым и т.п.).

Дальнейшие работы происходят в фазе исполнения (implementing) и контроля (controlling) проекта.

Этап 3. Поиск, выбор и закупка сырья и материалов

На следующем этапе выполняются работы по закупке сырья и оборудования, расширению и модернизации материально-технической базы.

В общем случае действия в рамках фармацевтической разработки целесообразно осуществлять после получения одобрения проекта. Однако при необходимости оптимизации времени процесса, в случае наличия большой доли уверенности в реализации проекта (по результатам оценки рисков менеджером), параллельно с этапом проработки могут быть предприняты действия по заказу и поставке сырья, реактивов и проч. в количестве, необходимом для дальнейших этапов проекта. Зачастую подобное решение значительно сужает временные рамки проекта, так

как сроки поставок для некоторых видов материалов могут быть достаточно длительными.

Качество готового лекарственного средства во многом определяется качеством фармацевтической субстанции (ФС). Поэтому особый акцент делается на установлении требований к производителю и качеству ФС, а также поиску таковых. Проводится оценка документации и образцов, сопоставление спецификаций мировых фармакопей и конкретных производителей, принимается во внимание стоимость, а также сроки и условия поставок.

Этап 4. Лабораторная разработка

В своей работе мы используем знания об особенностях сырья и режимов производственного процесса для обеспечения целевого качества лекарственного препарата. На основании первичных данных проработки технологии (Этап 2), включающих в себя изучение свойств ФС, прогнозирование состава, оценку рисков (в некоторых случаях проводятся не только теоретические работы, но и прикладные исследования), производится отработка состава на модельных образцах (МО), а также разработка первичных методов анализа. Наработанные МО подвергают процедуре «скрининга», включающей в себя оценку совместимости компонентов препарата между собой, предварительный выбор упаковочных материалов, стрессовые испытания.

Полученная информация по отработке состава является базой для создания раздела 3.2.P.2 «Фармацевтическая разработка» (ICH M4Q The common technical document) [3].

На данном этапе, на основании проработки литературных данных и по результатам апробации методов на модельных образцах, оформляется первичный проект фармакопейной статьи предприятия на готовый продукт. Базовые требования к содержанию спецификаций и пределы параметров определяются актуальными регламентирующими и руководящими документами (ГФ XIII [4] и фармакопеи других стран, ICH Q6 [5] и др.).

В большинстве случаев (особенно при использовании дорогостоящих ФС), по мнению разработчиков, целесообразно оценить стабильность выбранного состава до начала масштабных работ, которые требуют значительных расходов на покупку сырья, материалов и оборудования. Для этого предлагается проводить пилотные исследования образцов лекарственного препарата, полученного в лабораторных условиях (на протяжении 1–6 мес., в зависимости от природы ФС, количества знаний о разрабатываемом продукте и его лекарственной формы). В рамках изучения пилотной стабильности делается заключение о целесообразности последующих работ с применением данного состава и предлагаемых видов упаковки. Необходимость таких исследований зачастую определяется рисками получения значений параметров качества опытных и опытно-промышленных серий (в рамках фармацевтической разработки) и промышленных (при последующем коммерческом выпуске) серий, не соответствующих определенной спецификации при хранении, и другими ограничениями проекта (время, затраты, ресурсы).

Этап 5. Масштабирование (и перенос технологии)

Как следует из названия, данная фаза представляет собой эскалацию разработанной на предыдущих стадиях проекта технологии и является необходимой для подтверждения возможности крупномасштабного выпуска продукции. В соответствии с разработанным на предприятии стандартом масштабирование представляет собой двухшаговый процесс. Предварительно определяются требования к полупродуктам (спецификации, методы анализа), технологическая и аппаратная схема, режимы и объемы загрузки. На первой ступени проводится наработка одной минимальной опытно-промышленной серии. При этом оценивается степень отклонения осуществленного процесса от его теоретического представления, готовится протокол оценки рисков для последующих стадий и промышленного выпуска. На основании доработанных (при необходимости) режимов составляется опытно-промышленный регламент. Образцы из полученной серии подлежат анализу по проекту НД. Для препаратов системного действия также проводится тест (сравнительной) кинетики растворения. В некоторых случаях при несоответствии полученного продукта разработанной спецификации, желаемому профилю высвобождения (профилю растворения референтного препарата) или при значительных отклонениях от теоретического процесса целесообразно вернуться на предыдущий этап.

При удовлетворительных результатах наработки на образцах из полученной серии осуществляется валидация аналитических методов, а также валидация метода очистки. Одновременно разрабатываются протоколы валидации технологического процесса и исследования стабильности (полупродуктов и готового продукта).

Вторым шагом в масштабировании является наработка трех полноразмерных валидационных серий, в которых подтверждается стабильность производственного процесса. При этом осуществляется стандартизация размера серии, производственной рецептуры, критических параметров процесса. Полученные данные составляют основу пускового регламента. По

результатам оценки смывов с технологического оборудования заполняется отчет валидации процесса очистки. На этой же стадии предлагается стратегия контроля качества.

В зависимости от исходных условий проекта обозначенные выше работы осуществляются на площадке заказчика или на собственных мощностях. При необходимости проводится трансфер, предполагающий оценку производственной системы, подготовку протоколов трансфера с определением ответственности и рисков, перенос аналитических методов, обучение и технологический трансфер.

На данном этапе происходит завершение фармацевтической разработки как таковой, и последующие работы служат для подтверждения эффективности и безопасности разработанного лекарственного препарата [доклинические (Этап 7) и клинические исследования (Этап 8)].

Образцы валидационных серий подлежат обязательному исследованию стабильности по предварительно разработанным протоколам (Этап 6. Изучение стабильности ГЛС и полупродуктов). Наша лаборатория оснащена климатокамерами и помещениями арбитражного хранения, в которых возможно осуществлять хранение исследуемых образцов как при нормальных условиях (для данной климатической зоны 25 °С, 60% отн.), так и в ускоренных. Дополнительно возможна оценка фотостабильности исследуемых препаратов.

Данные этапов 3–6 используются для подготовки модуля досье по качеству (Этап 9).

Этапы 10 и 11. Регистрация готового лекарственного средства, включение в реестр фармацевтической субстанции

На протяжении регистрационных процессов менеджер проекта контактирует с регуляторными органами (посредством связи через собственный регуляторный отдел или представителя заказчика) в части предоставления образцов продукции для фармацевтической экспертизы и/или пояснений по запросам экспертов.

Этап 12. Терминация проекта

Завершение проекта определяется входными данными и может осуществляться:

– по решению заказчика;

– по усмотрению менеджера (в случае принятия решения о невозможности / отсутствии целесообразности осуществления работ);

– по завершении фармацевтической разработки;

– по факту регистрации нового лекарственного препарата (или внесения изменений в существующий продукт).

По результатам проекта формируется архив проекта, включающий в себя структурированную информацию, объем которой определяется внутренними процедурами и/или запросом заказчика.

ПРИМЕР ДОРАБОТКИ СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ДЖЕНЕРИКОВОГО МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО АМОКСИЦИЛЛИН И КЛАВУЛАНОВУЮ КИСЛОТУ

Комбинированные препараты амоксициллина и клавулановой кислоты действуют бактерицидно, угнетают синтез бактериальной стенки. Амоксициллин эффективен по отношению к бактериям, имеющим к нему чувствительность. За счет включения в препарат ингибитора бета-лактамаз (клавулановой кислоты) средство может назначаться и при инфекциях, резистентных к действию амоксициллина. Клавулановая кислота обладает высокой тропностью к пенициллиназам, благодаря чему образует стабильный комплекс с ферментом, что предупреждает ферментативную деградацию амоксициллина под влиянием бета-лактамаз. Препараты амоксициллина / клавулановой кислоты рекомендованы в качестве первой линии терапии заболеваний дыхательных путей.

Известно, что клавулановая кислота (и ее соли) термолабильна (рекомендуемые условия хранения +5±3 °С), чувствительна к воздействию влаги и кислорода воздуха. По этой причине манипуляции с данным видом сырья рекомендуется производить в инертной среде азота, а производственные процессы – при низкой относительной влажности воздуха (менее 20% отн.). Препараты, содержащие амоксициллин и клавулановую кислоту, покрывают барьерными пленочными покрытиями, а также предусматривают виды упаковки, обеспечивающие надежную защиту от обозначенных выше факторов внешней среды.

Целью фармацевтической разработки явилось изменение состава и технологии лекарственного препарата, содержащего амоксициллин и клавулановую кислоту, в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой, 250+125 мг, 500+125 мг и 875+125 мг на производственных мощностях заказчика. Причиной необходимости таких работ явился переход от использования готовых премиксов амоксициллина тригидрата и клавуланата калия (в соотношениях 2:1, 4:1 и 7:1, в зависимости от дозировки ГЛС) к раздельным действующим веществам из соображений экономической целесообразности, а также сни-

жения риска зависимости от единственного поставщика обозначенного выше премикса. Исходная технология получения таблетсмеси включала в себя сухое перемешивание компонентов, получение сухого гранулята (путем компактирования) и его опудривание. При этом риск получения некондиционных таблеток-ядер, обладающих недостаточной механической прочностью, оценивался как значительный. Стоит отметить, что при применении готовых премиксов амоксициллина и клавуланата данный технологический процесс оказывался оптимальным, в том числе ввиду невозможности применения влажного гранулирования.

На этапе проработки были оценены технологические возможности производителя, сырьевая база и объем работ (детальная оценка аналитической оснащенности не требовалась ввиду текущего коммерческого выпуска продукции). Цех пенициллиновых антибиотиков заказчика, помимо оборудования, использовавшегося в описанной выше технологии, был оснащен оборудованием для осуществления процесса влажного гранулирования. Были уточнены типоразмеры оснасток таблеточного пресса; сделано заключение о необходимости установки систем осушения воздуха в помещениях, в которых проводятся манипуляции с клавулановой кислотой; оценена пожаровзрывобезопасность установки для нанесения пленочного покрытия. Учитывая возможные трудности в решении поставленных задач, предлагалось осуществить этапы 3–6 разработки в полном объеме. В соответствии с регуляторными требованиями на момент проведения работ также предусматривалась необходимость проведения сравнительных доклинических исследований (изменение количественного и/или качественного состава более чем на 5%).

При проработке источников сырья и материалов были выбраны по два перспективных производителя амоксициллина тригидрата и клавулановой кислоты (разбавленной микрокристаллической целлюлозой в соотношении 1:1). Таким образом, предлагалось осуществить разработку состава для каждой из трех дозировок лекарственного препарата для четырех комбинаций фармацевтических субстанций. Задачу в части аналитики упрощало сходство спецификаций соответствующих ФС, однако технологические свойства субстанций амоксициллина различались, что делало необходимой разработку такой единой технологии, которая нивелировала бы эти различия.

Учитывая обозначенное выше, в качестве основного варианта была предложена технология, включающая влажное гранулирование амоксициллина с последующей сушкой полученного гранулята (до получения содержания влаги, не превышающего такового в исходном тригидрате) с дальнейшим перемешиванием полученного гранулята с премиксом клавулановой кислоты и опудривающими вспомогательными веществами.

На этапе лабораторной разработки были рассмотрены два связующих. Несмотря на удовлетворительные реологические свойства гранулятов, наработанных с применением обоих вспомогательных веществ, по результатам стрессовых исследований было принято решение отказаться от применения одного из них ввиду получения гранул светло-желтого цвета, что могло привести к получению желтых ядер таблеток. Выбранный состав обеспечивал производство прочного гранулята, что является необходимой базой для формирования ядер с надлежащими механическими свойствами. При этом также принималась во внимание необходимость получения профиля высвобождения готового лекарственного препарата, эквивалентного референту.

Процесс масштабирования велся итерационно: были выявлены недостатки разработанной таблетмассы, которые могли приводить к ее зависанию в бункере и затиранию в питателе таблеточного пресса, что служило бы причиной неоднородности получаемой серии. Путем варьирования содержания глидантов был минимизирован риск неравномерного дозирования с одновременной стабилизацией процесса таблетирования. Также экспериментально был выбран режим самого таблет-пресса с целью наработки прочных, гладких таблеток, без расслоений. Режим покрытия таблеток-ядер модификации не требовал.

На образцах из наиболее успешной наработки с окончательным составом были проведены работы по валидации аналитических методов и доклиническим исследованиям.

Результаты валидации технологического процесса трех серий каждой дозировки всех четырех комбинаций, включающих фармацевтические субстанции различных производителей, показали стабильность разработанного процесса и возможность получения качественного продукта, полностью соответствующего параметрам спецификации. Результаты стабильности валидационных серий соответствовали прогнозируемым трендам хранения. Для подтверждения эквивалентности продукта разработанного состава референтному препарату были проведены сравнительные исследования кинетики растворения *in vitro* при pH 1,2, 4,5 и 6,8. В модельной среде «раствор хлористоводородной кислоты pH 1,2» происходило быстрое разложение клавулановой кислоты и постепенное разложение амоксициллина. Поэтому статистическая оценка результатов не проводилась. Степень высвобождения действующих веществ в средах pH 4,5 и 6,8 из исследуемых препаратов составила более 85% за 15 мин. Полученные результаты подтвер-

дили эквивалентность сравниваемых препаратов без дополнительной математической оценки. Разработку признали успешной.

По завершении описанных выше работ был сформирован архив проекта и пакет документов на внесение изменений в досье лекарственного препарата в соответствии с актуальными регуляторными требованиями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Построение системы качества процесса фармацевтической разработки и определение основных вех позволило создать типовой регламент осуществления работ, специфичных при создании новой формуляции, состоящий из максимально унифицированных блоков. Несмотря на наличие рисков и ограничений в любом проекте, рассмотренный подход предлагает широкий простор для вариаций процесса при его одновременной детерминированности в части затрат ресурсов. Представленное выше дает возможность менеджеру планировать и осуществлять несколько проектов в одной временной области, без создания «узких мест». При этом члены проектной команды осознают свое положение и назначение, четкая детерминация выходных данных не предполагает двусмысленных толкований и подразумевает получение результата, что придает дополнительную мотивацию персоналу и делает работу эффективной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 29.12.2015) «Об обращении лекарственных средств».
2. ГОСТ Р ИСО 21500-2014. Руководство по проектному менеджменту. – М.: Стандартинформ, 2015.
3. ICH M4Q. The common technical document / International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2002.
4. ICH Q6. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 1999.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII издание. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015.

Рождение системы

mc development
Robust systems.
Provided.

www.mc-develop.com

- Локализация и организация контрактного производства твёрдых, мягких и жидких нестерильных лекарственных средств
- Фармацевтическая разработка лекарственных средств
- Разработка дизайна, сопровождение доклинических и клинических исследований
- Формирование досье и регистрация лекарственных средств «под ключ»

МК ДЕВЕЛОПМЕНТ
+7 495 269 00 16

Ингредиенты | Готовые лекарственные формы | Биофармацевтика | Контрактные работы | Технологии | Упаковка

Новые горизонты для развития вашего бизнеса



IPhEB & CPhI russia

mix with the world of pharma

30 марта – 01 апреля 2016 | МОСКВА, ВДНХ, 75 павильон

посетить выставку

Совместно с IPhEB&CPhI Russia

P-mec
Технологии и оборудование

InnoPack
Упаковка, доставка, медицинские изделия

За подробной информацией обращайтесь:
Тел.: +7 (812) 303-88-67
Email: nanopharm@restec.ru
pharmasales@restec.ru
www.ipheb.ru

Организаторы: РЕСТЭК® 25 лет НОВАЯ ИСТОРИЯ. НОВЫЕ СОБЫТИЯ; UBM

Специальный партнер: НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

УДК 615.12, 727.5

1 – ГБОУ ВПО
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., Moskow,
119991, Russia

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

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА: ОБЗОР ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ РАЗРАБОТКИ И НАРАБОТКИ ОПЫТНЫХ ПАРТИЙ ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Н.Б. Демина[1]*

Резюме. В статье дана краткая характеристика современным технологиям получения твердых лекарственных форм (ТЛФ). Приведен обзор технологического оборудования для лабораторной разработки и получения пилотных партий ТЛФ. В частности, в материале аккумулированы ответы на требования, предъявляемые технологами к конструкции технологического оборудования для выполнения следующих задач: измельчения твердых тел, смешивания порошкообразных веществ, увлажненных масс, грануляции, таблетирования, покрытия оболочкой и упаковки полученной ТЛФ.

Ключевые слова: фармацевтическая технология, твердые лекарственные формы, оборудование для смешивания, грануляции, таблетирования, покрытия оболочками.

PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT: REVIEW OF EQUIPMENT FOR LABORATORY DEVELOPMENT AND PILOT BATCHES PRODUCTION OF SOLID DOSAGE FORMS

N.B. Diomina[1]*

Abstract. The article summarizes the modern technologies for producing solid dosage forms (SDF). Was presented an overview of technological equipment for laboratory development and pilot batches production of SDF. In particular, this material accumulates answers to industrial engineers requirements for the design of processing equipment developed for solving following tasks: solids milling, powder and damp substances mixing, granulating, tabletization, coating and packaging of finished solid dosage form.

Keywords: pharmaceutical technology, solid dosage forms, equipment for mixing, granulation, tabletting, film coating.

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим этапом жизненного цикла лекарственных средств является фармацевтическая разработка, которая согласно современным положениям, принятым странами с развитой фармацевтической индустрией, призвана реализовывать принципы спланированного качества, потому что только правильно проведенная разработка будет являться своеобразным гарантом производства качественных, эффективных и безопасных лекарственных препаратов.

Различные аспекты фармацевтической разработки рассматриваются документами, принятыми международными организациями, основными из них являются:

– методическое руководство Pharmaceutical Development (Part I, Part II) ICH Q8 – «Фармацевтическая разработка» [1],

– «Качество путем разработки» – «Quality by Design – QbD» – документ, отражающий принципы спланированного качества, системный подход к разработке, основанный на надежных научных данных [2],

– «Управление рисками для качества» ICH Q9 «Quality Risk Management» [3].

Методические указания по проведению фармацевтической разработки содержит документ, принятый Международной конференцией по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для человека, – ICH Q8, отражающий этапы, наполнение, логику и требования. Согласно этому документу спланированное качество, или качество путем разработки, обеспечивает «системный подход к разработке, основанный на надежных научных данных и управлении рисками для качества продукции, который начинается с определения целей и уделяет особое внимание пониманию продукта и технологического процесса, а также контролю последнего» [1].

Фармацевтическая разработка включает этапы [4]:

– разработка технологии фармацевтической субстанции;

– разработка технологии готовой лекарственной формы (включая систему первичной упаковки);

– наработка лекарственного препарата для исследования;

– разработка и масштабирование технологического процесса;

– разработка аналитических методов.

В настоящее время разработка технологии лекарственного препарата проводится в три ступени, различающиеся масштабами и задачами.

Лабораторная разработка включает научные исследования по созданию продукта, отличается небольшими объемами. В задачи входит накопление знаний об активной субстанции, ее физико-химических свойствах, стабильности и биодоступности, обоснование и разработка состава и технологии лекарственной формы, методов анализа, выявление факторов и определение их допустимых диапазонов.

Этап масштабирования технологии соединяет лабораторную разработку лекарственного препарата и его промышленное производство. На практике он зачастую связан с необходимостью доработки и внесения корректив в состав и технологию продукта, что, в свою очередь, может привести к изменению его свойств. Как правило, масштабирование лабораторной разработки осуществляется в 2 этапа: пилотное и затем промышленное.

Пилотная наработка опытных партий в отличие от лабораторных исследований требует участия производственных специалистов, технологов. Информация о масштабируемости процессов, переносимых из лабораторного оборудования в пилотное, крайне важна для последующей организации производства. Собственно на этой стадии выявляются основные признаки организации будущего промышленного производства, «узкие места» как с точки зрения технико-экономических показателей всего производства, так и промышленной безопасности.

Перед пилотными лабораториями стоят задачи масштабирования процесса и наработки пилотной партии готовой лекарственной формы (ЛФ) для проведения доклинических и клинических исследований. Далеко не каждый продукт, прекрасно обрабатываемый в стандартном лабораторном оборудовании, позволяет проводить те или иные технологические операции с простым увеличением габаритов той или иной аппаратуры. При увеличении количества обращаемых веществ остро встают вопросы организации технологических процессов, а также безопасности организации той или иной технологической процедуры.

Оборудование для пилотных производств должно быть универсальным, чтобы оператор имел возможность изменять технологию в процессе работы, а впоследствии переориентировать его на реализацию других технологий.

Важнейшей стороной фармацевтической разработки является обоснование технологии производства, обязанной обеспечивать **постоянный** выпуск продукции с **заданными** функциональными характеристиками. С этой целью проводится изучение технологических факторов для установления пространства параметров, оценки рисков и создания программы управления. Отсюда очевидна необходимость применения для получения и масштабирования технологии лекарственных препаратов стандартных лабораторных приборов и оборудования. В зависимости от вида лекарственной формы лаборатория для разработки укомплектовывается линейками специального лабораторного оборудования, соответствующего аппаратурной схеме на производстве.

Лаборатория для разработки твердых лекарственных форм

К твердым лекарственным формам (ТЛФ) относятся: порошки, сборы, гранулы, таблетки, драже, пеллеты, капсулы.

Некоторые технологические операции, применяемые при производстве ТЛФ, являются общими для многих из них, так, например, измельчение, фракционирование, смешивание присутствуют в технологии практически всех ТЛФ; влажное/сухое гранулирование используют в технологии гранул, пеллет, таблеток; сферонизация применяется при получении гранул, пеллет; оболочками покрывают гранулы, таблетки, покрытия часто используются в технологии мультимодульных ЛФ. Дозирование порошков, гранул, пеллет, микротаблеток и даже таблеток может осуществляться в капсулах, поэтому названные выше технологические операции также актуальны при получении капсулированных лекарственных препаратов (ЛП).

Лаборатория R&D по разработке твердых лекарственных форм должна располагать различным лабораторным оборудованием для проведения всех названных технологических процессов. Примером такой лаборатории может служить *известное во всем мире многоцелевое оборудование компании ERWEKA – комплекс инструментов для лабораторных исследований, разработки и производства небольших партий продукции фармацевтической индустрии.* Лабораторный комплекс от производителя ERWEKA выделяется компактными габаритами, удобными регулировками, включает оборудование, аналогичное широко применяемому на производстве, что упрощает дальнейшее масштабирование технологического процесса [5].

Универсальный привод AR 403 является основой лабораторного комплекса технологической лаборатории. Устройство оснащено системой электронного управления скоростью, диапазон которой составляет от 0 до 400±1 об/мин. Для выполнения конкретных технологических задач привод снабжается насадками, имеющими модульный дизайн, что экономит рабочее пространство лаборатории, а также средства предприятия на приобретение различных одноцелевых устройств.

AR 403 – полифункциональный прибор, к которому можно присоединить множество дополнительных приспособлений для встряхивания, смешивания, гранулирования, нанесения покрытий, полировки, приготовления однородной вязкой массы, наполнения, дозирования. Насадки к универсальному приводу описаны ниже.

Измельчение

Измельчение твердых тел в фармацевтической технологии используется в производстве ряда лекарственных форм: порошков, сборов таблеток, гранул и др. В зависимости от конечных целей, дальнейшего использования, свойств измельчаемых материалов измельчение проводят до получения порошков крупного, среднего и мелкого помола.

Твердые материалы измельчают также с целью достижения необходимых технологических характеристик (насыпная масса, удельная поверхность). Измельченные порошки образуют более однородные смеси, что требуется для обеспечения однородности дозирования. Применение измельченных материалов способствует ускорению массообменных процессов при сушке, экстрагировании, растворении и в химических реакциях. Измельчение активных субстанций, сопровождающееся увеличением удельной поверхности, может способствовать повышению биологической доступности и терапевтической эффективности лекарственных веществ в лекарственных формах. Совместное измельчение двух и более ингредиентов лежит в основе ряда современных технологий создания эффективных лекарственных препаратов, например за счет механоактивации или получения соединений-включения. При этом рекомендуют использовать оборудование, в котором измельчение осуществляется за счет удара и истирания. Примером такого оборудования является шаровая мельница, отличающаяся надежностью, простотой конструкции и эксплуатации.

Шаровая мельница (KM) – насадка к универсальному приводу ERWEKA. Универсальная шаровая мельница (KM) позволяет быстро и качественно измельчать кристаллические вещества, а также смешивать сухие материалы до получения однородного состава.

В шаровой мельнице измельчение происходит за счет двух основных процессов: удара и истирания, при сочетании которых достигается максимальная эффективность. Для эффективного измельчения полый барабан заполняется шарами на 30-50%. Фарфоровые шары диаметром от 30 до 50 мм обеспечивают тщательное измельчение кристаллического материала. Одновременное использование шаров различных размеров способствуют лучшему измельчению порошков, так как большие шары обладают высокой силой удара, а маленькие заполняют пространство между большими, обеспечивая более тонкое измельчение.

Барабан и измельчающие шары при необходимости можно стерилизовать.

Смешивание порошкообразных веществ

Смешивание широко используют в фармацевтической технологии при переработке сухих сыпучих материалов. При получении ЛФ равномерное распределение компонентов в полученной смеси обеспечивает однородность дозирования, что крайне необходимо при производстве ЛП, поэтому качество смешивания – важная характеристика производственного процесса, которая зависит от правильно подобранного оборудования, размеров частиц исходного сырья, длительности проведения процесса и др.

Для смешивания порошкообразных ингредиентов применяют смесители различной конструкции. В линейке лабораторного оборудования ERWEKA имеются несколько емкостных смесителей, предназначенных для смешивания свободно падающих порошков и гранул: двухконусный смеситель (DKM), кубический смеситель (KB) и V-образный. Существенное достоинство смесителей – это простая конструкция, повторяющая аналогичное промышленное оборудование. Другое преимущество заключается в том, что смешиваемая композиция контактирует исключительно со стенками стерильно чистой и герметически замкнутой емкости. Объемы смесителей – от 3,5 до 11,8 л, что позволяет их применять как для лабораторных, так и для пилотных наработок

В целях корректной работы прибора и получения смеси с заданными характеристиками не рекомендуется заполнять смешивающий сосуд более чем на 40% от его объема.

Смешивание увлажненных масс

В технологии ТЛФ приходится смешивать не только сухие порошкообразные ингредиенты. При проведении влажной грануляции смесь порошков равномерно увлажняют раствором связующего. Смесители, пригодные для этой цели, как правило, снабжены мощными перемешивающими элементами, способными гомогенизировать тяжелую увлажненную порошковую смесь. Однородность смешивания зависит от правильности подбора оборудования, размеров частиц исходного сырья, длительности процесса и др.

Лабораторный смеситель для увлажненных масс ERWEKA LK5 – насадка к универсальному приводу ERWEKA. С его помощью можно получить максимально однородную смесь с нужными характеристиками за счет универсальной конструкции смешивающего контейнера и Z-образных перемешивающих устройств, выполненных из нержавеющей стали и осуществляющих асинхронное разнонаправленное вращение. Рабочий барабан имеет прозрачную акриловую крышку для наблюдения за процессом и защитный датчик, предотвращающий случайный запуск смесителя при открытой крышке.

Для получения равномерной и корректной работы прибора рекомендуется загружать 5-литровый контейнер исходными компонентами не более чем на 65% от его объема.

Гранулирование

Если смесь порошкообразных ингредиентов обладает хорошей сыпучестью, прессуемостью, однородна по составу и не прилипает к пресс-инструменту, таблетки можно получать прямым прессованием. В противном случае для улучшения перечисленных свойств смесь ингредиентов гранулируют и только после этого прессуют на таблеточных прессах.

Большая часть порошкообразных субстанций имеет неудовлетворительные технологические характеристики: низкую сыпучесть, плохую прессуемость, а смеси порошков с частицами разной формы, плотности и диапазона размеров стремятся к сегрегации. К сожалению, стандартных таблеток из такой смеси не получится, в первую очередь не удастся добиться однородности дозирования, а также удовлетворительной прочности и истираемости.

После гранулирования многие недостатки таблеточной смеси снимаются, гранулы обладают хорошими показателями сыпучести и прессуемости, расслаивание смеси на индивидуальные ингредиенты после гранулирования становится невозможным. Поэтому, несмотря на все преимущества прямого прессования, на производстве таблеток чаще применяется технологическая схема, предусматривающая предварительное гранулирование таблеточной массы.

В зависимости от агрегатного состояния связующего различают **влажную и сухую** грануляцию. Если при взаимодействии с водой физико-химические свойства компонентов не изменяются, гранулирование можно осуществлять как влажным, так и сухим способом.

Влажная грануляция на производствах наиболее распространена. До недавнего времени лидером в этом направлении была грануляция продавливанием, подразумевающая выполнение нескольких технологических операций: смешивание порошков, увлажнение раствором связующего, формирование гранул в результате продавливания увлажненной массы через перфорированную сетку гранулятора, сушка, повторное продавливание высушенных гранул.

В линейке лабораторного оборудования ERWEKA для реализации этой технологии имеется специальная *насадка-гранулятор FGS* к универсальному приводу. В стандартный комплект входят два сита с ячейками размером 1,0 и 1,6 мм, дополнительно гранулятор может быть оснащен следующими ситами: 0,315; 0,63; 0,8; 1,0; 1,25; 1,6; 2,0; 2,5 и 3,15 мм. Максимальная производительность аппарата 30 кг/ч, в соответствии с размером отверстий сита. Все части установки, которые вступают в контакт с продуктом, изготовлены из нержавеющей стали. Относительно высокая производительность агрегата позволяет его применять не только в лабораторных исследованиях, но также при разработке пилотных технологий.

Коническая мельница – насадка к универсальному приводу ERWEKA – пригодна для работы с липофильными, термочувствительными, вязкими, увлажненными продуктами, а также для калибровки порошкообразных и свободно текучих продуктов, например гранул, через вертикальные сита (0,3–3,0 мм) с перфорированными круглыми или квадратными отверстиями для получения однородного гранулята. Размер гранул регулируется путем установки сит с отверстиями определенного размера, регулированием зазора между ножом и ситом, а также регулированием скорости.

Для более точной настройки процесса скорость вращения регулируется от 60 до 1200 об/мин и подбирается оптимальный диаметр сита (стандартный – 1,5 мм, дополнительный набор сит – от 0,5 до 3,0 мм с шагом 0,25 мм).

Производительность мельницы от 20 до 150 кг/ч позволяет применять ее как для небольших объемов продукции, так и для пилотного масштабирования процесса.

Сухая грануляция

Сухое гранулирование используется в том случае, если исходные вещества разлагаются в воде, если они липофильны и плохо смачиваются склеивающим раствором. При сухом гранулировании порошкообразный материал подвергают первоначальному уплотнению (брикетированию) с последующим размалыванием. В результате получают гранулят, который затем таблетируют, то есть подвергают вторичному уплотнению. Сухое гранулирование исключает промежуточные процессы, такие как увлажнение, смешивание и сушку, способные оказать негативное воздействие на активную субстанцию и другие ингредиенты смеси. ERWEKA выпускает специальную насадку к универсальному приводу для *сухой грануляции способом брикетирования и размола таблеток TG 2000*. Полученные этим способом гранулы имеют неправильную форму, плотные, с низкой пористостью, и как следствие, относительно заниженной распадаемостью. Двойное уплотнение вследствие брикетирования и последующего таблетирования способствует их большей плотности и низкой водопроницаемости, в то время как пористые гранулы распадаются легче. Однако, если смесь порошков имеет низкую сыпучесть, высокую долю пылевой фракции, низкую растворимость, склонность к расслаиванию или низкую насыпную плотность, а также если лекарственное вещество подвергается гидролизу или является термолабильным, решением этих проблем может стать приготовление гранул методом сухой грануляции.

Таблетирование

В настоящее время для производства малых и крупных серий применяются таблеточные прессы двух типов: ударного и ротационного. Для получения небольших количеств продукции лаборатории оснащают прессами небольшой производительности. Однопуансонный пресс имеет существенное преимущество в цене приобретения и эксплуатационных затратах по сравнению с ротационным. Он используется для по-

лучения первоначальной информации об уплотнении и о необходимом количестве вспомогательных веществ, в то же время пригоден для мелкосерийного производства.

С помощью *однопуансонного эксцентрикового таблеточного пресса типа EP-1* ERWEKA можно прессовать таблетки круглой или иной формы диаметром от 4 до 20 мм. Все компоненты EP-1, за исключением передней дверцы, изготовлены из высококачественной нержавеющей стали марки AISI 316 с хромированным покрытием, прозрачная передняя дверца выполнена из акрила. Таблетпресс EP-1 оборудован дисплеем, на котором отображается регулируемая величина сжимающего усилия, она может достигать 3000 кг/с, максимальная производительность пресса 4000 циклов/ч.

Получение пеллет

Наиболее важное с позиции технологичности свойство пеллет – сферическая форма и узкий разброс размера частиц, что, в свою очередь, является идеальными условиями для дальнейшего нанесения покрытия. В числе других преимуществ пеллет немаловажное значение имеет их способность обеспечивать заданные параметры высвобождения без создания локальных участков с избыточной концентрацией. Вследствие малых размеров при пероральном приеме они способны проходить через спазмированные (при патологиях) участки желудочно-кишечного тракта. Большая поверхность контакта со слизистой может служить основанием повышения терапевтической эффективности лекарственных веществ, действующих в кишечнике. В частности, пищеварительные ферменты, включенные в пеллеты, будут смешиваться с химусом и распределяться в кишечнике лучше, чем таблетированные ферменты .

Пеллеты являются мультифункциональными формами, так как могут помещаться в твердые желатиновые капсулы или спрессовываться в таблетки, возможно также смешивание различных видов пеллет в одной оригинальной лекарственной форме, что позволяет варьировать ее состав и дозировку.

Инновационные лекарственные препараты, представляющие собой мультимодульные системы на основе множественных пеллет (Multiple Unit Pellet System, MUPS) в настоящее время уже применяются в практической медицине. Пеллеты, применяемые в создании MUPS, как правило, различаются составом и структурой и обеспечивают заданные параметры высвобождения, свойственные данному типу носителей, без создания локальных участков с избыточной концентрацией. При совместном присутствии за счет наложения эффектов формируется общий фармакокинетический профиль ЛП [6].

Управление кинетикой высвобождения осуществляется модификацией составов и структуры пеллет. Они могут содержать различное количество полимера и активного ингредиента, могут быть изготовлены из различных полимеров, которые и определяют скорость высвобождения. Внутренние и наружные слои микроносителей могут быть созданы различными материалами. В состав пеллет включают модификаторы высвобождения – вещества, ускоряющие его или замедляющие, мукоадгезивные компоненты, стабилизаторы и другие функциональные добавки. Различная структура – мембранного типа или матричного – также влияет на профиль высвобождения. Таким образом, научно обоснованное применение варьируемых факторов позволяет осуществлять точное контролирование параметров высвобождения.

Несомненные преимущества модульных систем доставки заключаются в том, что при использовании обычных технологий гранулирования и покрытия оболочками они дают широкие возможности для создания инновационных лекарственных препаратов.

В лаборатории технология получения пеллет может быть осуществлена с помощью последовательного применения гранулятора, пеллетайзера и коатера.

Пеллетайзер *ERWEKA GTE* – насадка к универсальному приводу ERWEKA – отличается простотой эксплуатации и ухода. Плавное вращательное движение поддона обеспечивает постепенный подъем материала к его верхней части, после чего, перемешиваясь, он вновь опускается к основанию. Этот процесс повторяется неоднократно. Формирование пеллет начинается после добавления требуемого количества влаги и происходит при постоянном перемешивании материала, гарантируя строго определенное содержание отдельных компонентов смеси в каждой грануле. Освобождение устройства происходит по мере его заполнения: готовые гранулы начинают переваливаться через нижний край поддона и собираться в приемном контейнере.

Покрытие таблеток и гранул

С помощью современных вспомогательных веществ и технологий нанесения покрытий на таблетки (гранулы) появилась возможность существенно улучшить свойства лекарственной формы. Если пару десятков лет назад таблетки покрывали оболочками для маскировки вкуса, запаха фармацевтической субстанции, придания привлекательного внешнего вида, для стабилизации при хранении и при использовании, для снижения раздражающего действия лекарственного вещества, то в настоящее время с помощью покрытий стали модифицировать параметры высвобождения.

Лабораторный коатер DKE – насадка к универсальному приводу ERWEKA (дражировочный аппарат) – выпускают двух типоразмеров, в обоих случаях из нержавеющей стали. Рабочая вместимость аппарата составляет около 30% от номинальной, в зависимости от угла его установки: тип DKE при номинальной вместимости 9,5 л допускает загрузку до 2 кг ядер таблеток за один рабочий цикл, тип DKS при номинальной вместимости 15 л допускает загрузку до 5 кг ядер таблеток за один рабочий цикл.

Сушку таблеток в процессе покрытия можно ускорить с помощью ИК-лампы, которую крепят на рукоятке универсального редуктора.

Таким образом, лабораторный комплекс ERWEKA включает оборудование для реализации практически всех необходимых технологических операций по минипроизводству твердых лекарственных форм. Однако многообразие промышленного оборудования диктует необходимость применения при разработке соответствующего лабораторного оборудования. Ведь не секрет, что не только состав лекарственного препарата определяет его свойства, но и применяемые при его изготовлении технологические процессы.

Измельчение

На стадиях разработки зачастую имеется лишь небольшое количество действующего вещества – граммы или доли граммов, ценность которых очень трудно переоценить. Для измельчения таких количеств вещества нужны очень маленькие приборы, иначе вещество просто осядет на стенках оборудования. Лабораторные струйные мельницы могут решить эту задачу.

Струйные мельницы предназначены для сверхтонкого измельчения (10–150 мкм) всех типов порошкообразных материалов с гарантированным отсутствием загрязнения продукта.

К преимуществам струйных мельниц относят:

- отсутствие мелющих тел, в результате полученный тонкодисперсный материал не будет загрязнен продуктами износа. Материал измельчается только за счет столкновения частиц между собой. Подвод энергии для измельчения осуществляется сжатым воздухом;
- регулируемые размеры частиц готового продукта;
- малые габариты установок, помольные камеры которых могут изготавливаться из дорогостоящих высококачественных материалов.

К особенностям работы оборудования относят необходимость разделения пылегазовой смеси, для чего применяется пылеочистное оборудование.

Лабораторные струйные мельницы [6]. PilotMill-Zero является самой маленькой доступной на рынке струйной мельницей. Это спиральная вихревая мельница F.P.S. с единовременной загрузкой всего **10…200 мг!** Результаты испытания мельницы в собственном испытательном центре F.P.S. показали на примере измельчения лактозы, что при загрузке 10 мг выход составляет 75%; при загрузке 20 мг – 82%; при загрузке 200 мг выход достигает 95%. Очень удобно, что интегрированный динамический воздушный классификатор размещен в одном корпусе с мельницей и может быть легко перестроен на требуемую измельченность с электронного блока управления.

LaboMill и PilotMill-1 дополняют линейку лабораторных струйных мельниц компании F.P.S., которая охватывает не только потребности фармацевтических R&D-лабораторий; серия мельниц PilotMill также может быть использована на небольших производствах. Размер партии варьируется от 1 до 250 кг в зависимости от марки мельницы.

Гранулирование

Ролл-компактирование. В последние годы процесс ролл-компактирования привлекает все больше внимания. В отличие от влажной грануляции процесс получения гранул осуществляется без увлажнения и не требует сушки. Поэтому ролл-компактирование рекомендуют в качестве альтернативы влажной грануляции влагочувствительных субстанций. К преимуществам процесса относят автоматизацию, отсутствие пылеобразования, компактность оборудования.

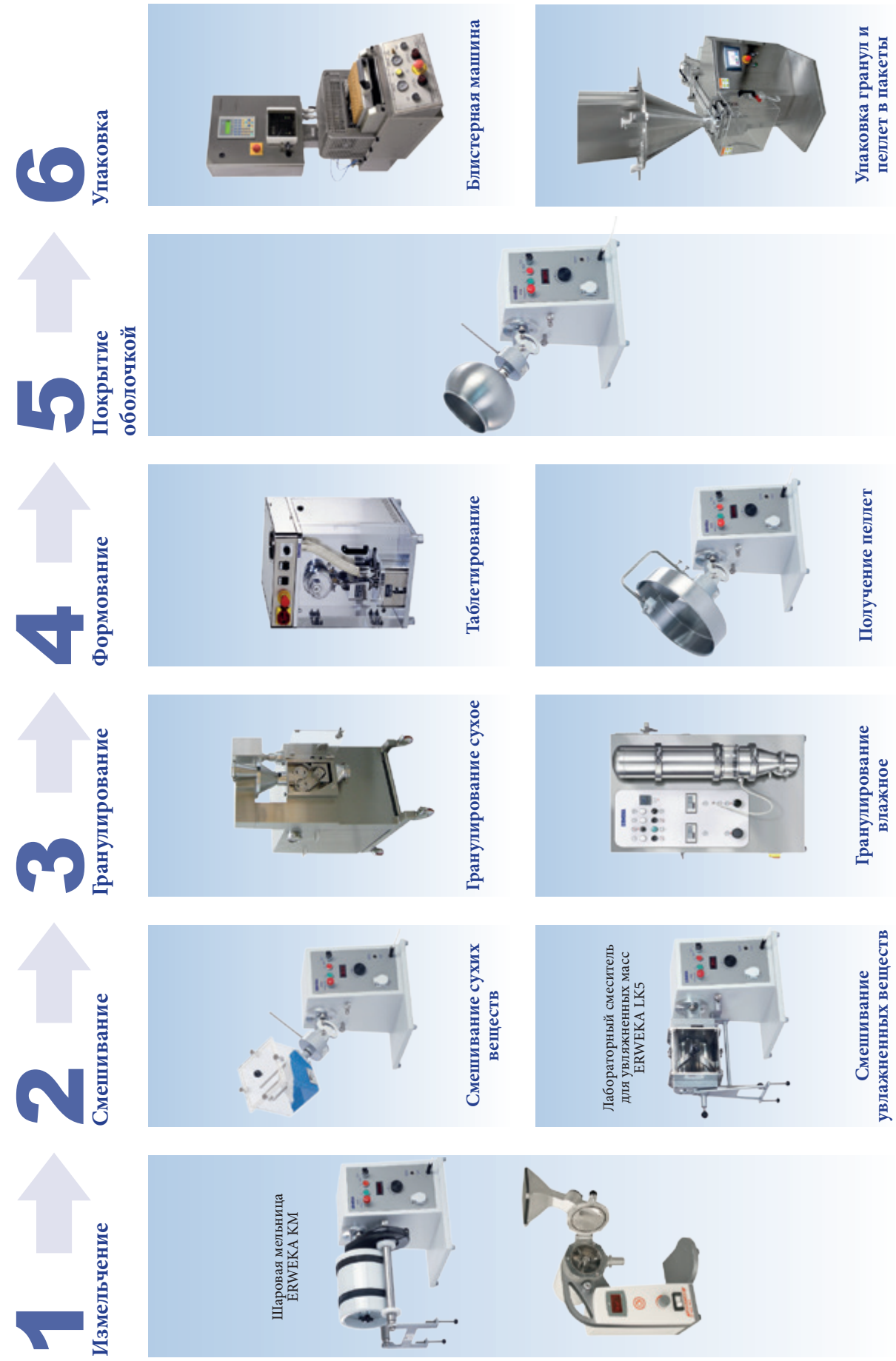
Полученные способом роликового компактирования гранулы имеют неправильную форму, низкую пористость и, как следствие, могут демонстрировать заниженную распадаемость. Высокое давление, используемое в процессе получения гранул, способствует их большей плотности и худшей водопроницаемости, в то время как пористые гранулы распадаются легко. Поэтому сухое гранулирование целесообразно



Механические мельницы



Вихревые мельницы


1 Измельчение
2 Смешивание
3 Гранулирование
4 Формование
5 Покрытие оболочкой
6 Упаковка
Шаровая мельница ERWEKA KM
Смешивание сухих веществ
Лабораторный смеситель для увлажненных масс ERWEKA LK5
Смешивание увлажненных веществ
Гранулирование сухое
Гранулирование влажное
Таблетирование
Получение пеллет
Блистерная машина
Упаковка гранул и пеллет в пакеты



Роллер-компактор RCC 100x20

применять в том случае, когда не возможно применение влажного гранулирования.

Роликовый компактор обычно состоит из трех основных блоков:

- системы транспорта порошка в области уплотнения между валками;
- блока уплотнения, в котором порошок прессуют между двумя валками;
- блока измельчения ленты до желаемого размера частиц.

Ролл-компактор вдавливает сухой порошок между двумя валиками, вращающимися в противоположные стороны, и сжимает материал в твердые компактные брикеты в форме листов или хлопьев. После этого брикеты измельчаются и фракционируются, в результате получают гранулы нужного размера. Процесс экономичен, потому что сухое гранулирование по сравнению с влажным исключает такие промежуточные процессы, как увлажнение, перемешивание и сушка.

Поскольку гранулы образуются только за счет сжатия, важную роль играют использованные вспомогательные вещества. В этом процессе применяют наполнители, предназначенные для прямого прессования, чаще всего это МКЦ, однако возможно также применение хрупких наполнителей, таких как лактоза, маннитол, дикальция фосфат.

Регулировать качество гранул можно изменением давления прессования, скорости вращения валков, скорости подачи материала (вертикальной и горизонтальной), величины зазора между валками и др.

К недостаткам и ограничениям метода относят: наличие в продукте значительного количества мелкой фракции, снижение эффективности некоторых субстанций за счет уплотнения, прилипание материала к роликам.

Способ применим для гранулирования смесей, содержащих сухие экстракты, плохо прессующиеся порошки, а также составов для матричных ЛФ пролонгированного высвобождения, например на основе ГПМЦ [7]. Примеры составов гранулируемых композиций приведены в таблице 1

Роллер-компактор *RCC 100x20* предназначен для работы в условиях частой смены производимых продуктов и удобен в очистке. Минимальное количество гранулята – которое можно получить на RCC 100x20, составляет всего 10–20 г. В то же время максимальная производительность гранулятора 10 кг/ч, что делает возможным его применение для наработки пилотных партий.

Влажное гранулирование в смесителе-грануляторе

В настоящее время смесители-грануляторы широко распространены. Они предназначены для влажной грануляции порошков, в процессе которой происходит уплотнение продукта. Гранулятор представляет собой емкость, на дне которой смонтирован ротор с Z-образными лопастями. При вращении ротора происходит интенсивное перемешивание порошка, при добавке раствора связующего вещества образуются гранулы. Измельчитель на боковой стенке предотвращает образование крупных агломератов.

Образующиеся гранулы имеют более плотную и более ровную поверхность, в процессе качения по поверхности пылевая фракция адсорбируется на поверхности гранул.

Таблица 1.

Примерные составы для ролл-компактирования

Субстанция	*Hypericum perforatum*, сухой экстракт	Парацетамол
Состав	сухой экстракт – 20% МКЦ Avicel PH 101, FMC Biopolymer – 70,5% кукурузный крахмал, Melon – 7% полисахариды сои Emcosoy, JRS Pharma GmbH – 2% гидрогенизированное растительное масло Lubritab, JRS Pharma GmbH – 0,5%	парацетамола – 60% МКЦ Avicel PH 101 – 37,5% кроскармелоза натрия Vivasol, JRS Pharma GmbH – 2% магния стеарат – 0,5%
Примечание	Сухие экстракты при увлажнении могут необратимо потерять качество	Парацетамол является известным, плохо прессующимся веществом, непригодным для прямого прессования. Таблетки парацетамола практически всегда получают с влажной грануляцией

Технология требует меньшего количества жидкого связующего по сравнению с другими способами влажного гранулирования, в некоторых случаях дополнительно рекомендуется фракционирование полученных гранул

При небольших размерах партии высушивание гранулята может производиться в грануляторе. Для этого производителем предусмотрена подводка вакуумной линии (для сушки гранулята в вакууме) или нагревание рабочей емкости.

Лабораторный смеситель-гранулятор «Glatt TDG» для влажной грануляции может работать с объемами веществ 0,3–5 дм^3. Для этого он снабжен колбами для грануляции различного объема, которые легко снимаются, колбы выполнены из полиакрила. Более производительный гранулятор Glatt серии VG предназначен для работы с материалом объемом от 10–65 л. Замена контейнеров с легкостью производится в течение нескольких минут и не требует наличия специальных инструментов.

Смешивание, гранулирование, покрытие в аппарате с псевдоожиженным слоем

Трудоемкую и громоздкую технологию гранулирования продавливанием на фармацевтических предприятиях все чаще вытесняет гранулирование в аппаратах с псевдоожиженным слоем. Эти аппараты также могут осуществлять покрытие гранул оболочкой. С этой целью разработаны компактные лабораторные устройства.

Гранулятор с псевдоожиженным слоем Mini Glatt предназначен для смешивания, гранулирования и сушки небольших объемов материала – от 25 до 375 г. При опциональном дооснащении Micro-Kit можно осуществлять сушку и последующее гранулирование меньших объемов исходных веществ – от 2,5 до 25 г. Рабочее давление воздуха составляет 4–5 бар, на выходе воздух проходит через металлические картриджные фильтры с ячейками размером, теоретически равным 10 мкм. Glatt может быть демонтирован в течение нескольких шагов, легок в очистке.

Логическим продолжением является система с псевдоожиженным слоем Midi-Glatt, предназначенная для обработки партий объемом 375–1350 г.

Упаковка – очень важный элемент лекарственного препарата, отвечающий за его стабильность в процессе хранения. Обоснование срока годности лекарственного средства невозможно без применения качественной упаковки.

Полуавтоматический настольный блистерпак O.M.A.R. FANTASY:

- настольный прибор с пневматическим приводом, предназначен для работы в условиях небольших производств или исследовательских лабораторий.

Fantasy производит блистерные упаковки горячего и холодного формования (PVC/Alu или Alu/Alu). За один рабочий цикл производится 4 блистера. В машине имеется одна станция, на которой происходит формовка, заполнение и заваривание блистеров. Машина комплектуется оснасткой, рассчитанной на один (любой) формат блистера.

Предварительно нарезанные ПВХ и фольга вручную подаются на рабочий стол, и все остальные операции производятся нажатием двух кнопок на передней панели устройства. Простота операций требует минимальных навыков от рабочего персонала. Возможно дополнительное оснащение охладительной установкой. Производительность машины – 8 циклов в минуту (для производства 4 стандартных блистеров 100х60 мм требуется три цикла), до 640 блист/ч. Максимальная глубина формования – 13 мм, максимальные размеры блистера 100х60 мм, температура нагрева – до 200 °С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно ICH Q фармацевтическая разработка представляет собой «комплексные экспериментальные исследования для научного обоснования вида ЛФ, ее состава и структуры, технологии получения, типа упаковки, стабильности и контроля» [1]. Применение современного стандартного лабораторного оборудования на этапе разработки позволит получить надежные научные данные о препарате, дать информацию о производственных процессах и их контроле, необходимую для дальнейшего обоснования пространства разработки и создания программы управления рисками для качества продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. ICH Q8(R2). PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT // Current Step 4 version.- August 2009.
2. Quality by design. URL: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000162.jsp (дата обращения 20.01.2016).
3. ICH Q9 Quality Risk Management. URL: http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/quality-risk-management.html (дата обращения 20.01.2016).
4. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. С.Н. Быковского, И.А. Василенко, Н.Б. Деминой, И.Е. Шохина, О.В. Новожилова, А.П. Мешковского, О.Р. Спицкого. – М. Изд-во Перо, 2015. 526 с.
5. ERWEKA GmbH. URL: http://erweka-rus.ru/ (дата обращения 20.01.2016).
6. F.P.S. URL: http://phct.ru/fps/ (дата обращения 20.01.2016).
7. I. Jeon, T. Gilli, G. Betz et al. Pharmaceutical Technology Europe. 2009. V. 21. Is. 12.

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

- 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

УДК 615.036, 615.065

1 – ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», 121552, Россия, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, 15А

1 – LLC «AZT PHARMA K.B.», 15A, 3-rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: azt@aztfarma.ru
Тел.: 8 (495) 414 65 65

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ НУКЛЕОЗИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ (НИОТ) – ФОСФАЗИДА И ЛАМИВУДИНА

А.Ф. Хохлов[1], Б.В. Бровченко[1]*, А.А. Смирнов[1]

Резюме. В статье рассматривается процесс разработки комбинированного лекарственного препарата Фосфаладин®, предназначенного для лечения ВИЧ-инфекции, на основе фосфазида и ламивудина. Приведен краткий обзор эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции с учетом политики импортозамещения в фармацевтической отрасли, а также вопросов обеспечения ВИЧ-инфицированных пациентов необходимой терапией. Рассмотрены этапы фармацевтической разработки комбинированного лекарственного препарата и особенности подготовки доклинического и клинического блоков регистрационного досье.

Ключевые слова: фосфазид, ламивудин, комбинированный лекарственный препарат, терапия ВИЧ-инфекции, фармразработка.

DEVELOPMENT AND REGISTRATION OF A COMBINED DRUG FOR THE TREATMENT OF HIV INFECTION ON THE BASIS OF ON NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS (NRTI) PHOSPHAZIDE AND LAMIVUDINE

A.F. Khohlov[1], B.V. Brovchenko[1]*, A.A. Smirnov[1]

Abstract. The article discusses the development process of a combined medicinal product **Phosphaladin®** intended for the treatment of HIV infection, based on phosphazide and lamivudine. A brief review of epidemiological situation on HIV infection taking into account the import substitution policy in the pharmaceutical industry, as well as the problem of providing HIV-infected patients require therapy. Considers the issues of pharmaceutical development combined drug and preparation of preclinical and clinical units of the registration dossier.

Keywords: phosphazide, lamivudine, combined medicine, therapy of HIV infection, pharmaceutical development.

ВВЕДЕНИЕ

По статистике за 2014 год [1] и 10 месяцев 2015 года [2] эпидемическая ситуация по ВИЧ-инфекции в России продолжает ухудшаться. По итогам заседания Правительственной комиссии по вопросам охраны здоровья граждан [3], проходившей 23 октября 2015 г., министром здравоохранения В.И. Скворцовой и председателем Правительства РФ Д.И. Медведевым определена стратегия противодействия распространению ВИЧ-инфекции, которая должна быть реализована к ноябрю 2016 г. [3].

Главными направлениями противодействия распространению ВИЧ-инфекции на государственном уровне являются:

- бесперебойная поставка лекарственных препаратов для профилактики и лечения ВИЧ-инфекции во все субъекты федерации;
- масштабная информационная работа с привлечением средств массовой информации и общественных организаций об опасности инфекции, профилактике и факторах ее предупреждения;
- совершенствование схем лечения ВИЧ-инфекции с позиций доступности, эффективности и безопасности;
- концентрация усилий на уязвимых к инфекции группах населения, включая наркозависимых;
- разработка и введение в оборот российских препаратов для лечения ВИЧ-инфекции в рамках федеральной целевой программы «Фарма-2020» [3].

На текущем этапе доля импортных препаратов для лечения ВИЧ-инфекции достаточно велика [4] (распределение денежных средств по комбинированным препаратам группы НИОТ см. на рисунках 1 и 2). Помимо стратегии «Фарма-2020» Министерством промышленности и торговли

Российской Федерации в марте 2015 г. введен в действие приказ «Об утверждении отраслевого плана мероприятий по импортозамещению в отрасли фармацевтической промышленности Российской Федерации» [5], нормами которого предусмотрено значительное увеличение доли антиретровирусных препаратов российского производства к 2020 году.

Тем не менее прирост зарегистрированных случаев инфицирования ВИЧ наблюдается каждый год и составляет в среднем около 10% от общего числа выявленных случаев заражения. Данные Росстата и UNAIDS (подразделения ООН, занимающегося противодействием распространению ВИЧ-инфекции) разнятся, причем по данным UNAIDS распространенность ВИЧ-инфекции выше [3]. Текущий уровень финансирования (по данным за 2015 г.) позволяет обеспечить антиретровирусной терапией не более 23% от общего числа ВИЧ-инфицированных пациентов (около 200 тыс. пациентов [1–3]). И только при охвате лечением не менее чем 60% ВИЧ-инфицированных пациентов регресса заболевания, по мнению министра здравоохранения РФ, можно достигнуть к 2023 г., а «для кардинального изменения эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции необходимо увеличение охвата лиц лечением на основе современных схем, в том числе с использованием отечественных препаратов» [3].

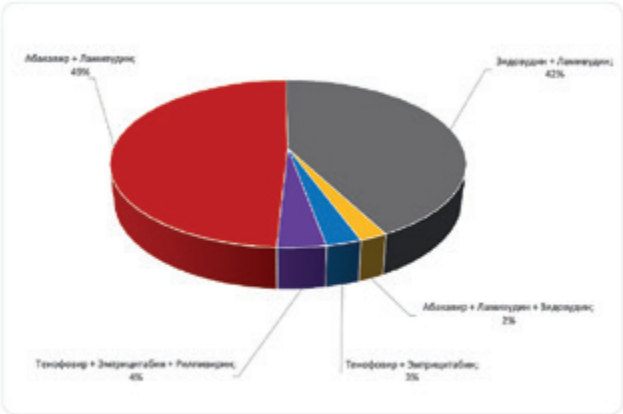


Рисунок 1. Распределение денежных средств по комбинированным лекарственным препаратам (ЛП) группы НИОТ (по МНН) за 2014–2015 гг. (данные с сайта zakupki.gov.ru)

В настоящее время единственным антиретровирусным препаратом отечественной разработки и производства группы НИОТ[1] является фосфазид, выпускаемый под торговым наименованием Никавир® компанией «АЗТ ФАРМА К.Б.» по полному циклу более 15 лет и зарекомендовавший себя для лечения и профилактики [4] ВИЧ-инфекции как доступное, эффективное и безопасное средство [6].

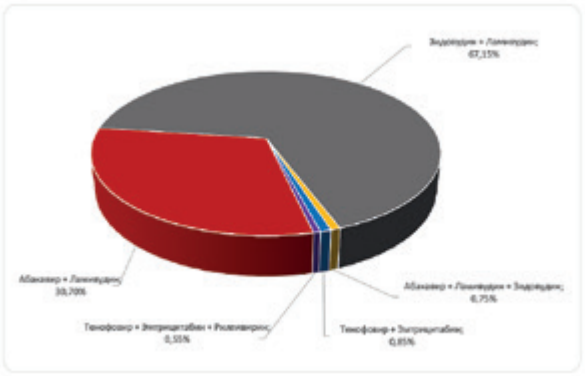


Рисунок 2. Распределение комбинированных ЛП группы НИОТ (по МНН) в процентном выражении от общего количества пациентов за 2014–2015 гг. (данные с сайта zakupki.gov.ru)

В 2012 г. в научно-медицинском периодическом издании «ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии» [7] коллективом авторов, представляющих Санкт-Петербургский Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (Санкт-Петербург, Россия) и Клиническую инфекционную больницу им. С.П. Боткина (Санкт-Петербург, Россия), была опубликована статья, содержащая обращение к компании-производителю препарата Никавир® с целью введения в обращение дополнительной дозировки – 400 мг. Обращение было основано на более чем десятилетнем опыте применения препарата и современных рекомендациях по оптимизации схем приема пациентом антиретровирусных препаратов, направленных на увеличение приверженности пациентов к терапии ВИЧ-инфекции.

Учитывая совершенствование схем антиретровирусной терапии и значимость введения в обращение дополнительной дозировки монопрепарата фосфазида (400 мг), группой разработки компании «АЗТ ФАРМА К.Б.» были проведены изучение и анализ современных клинических рекомендаций, национальных руководств по диагностике и лечению ВИЧ-инфекции и СПИДа, протоколов диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией, соответствующих научных публикаций [8–11]. По результатам анализа был сделан вывод, что в Российской Федерации фосфазид наиболее часто применяется в комбинации с ламивудином как в предпочтительных, так и в альтернативных схемах антиретровирусной терапии (АРВТ) у взрослых пациентов. Исходя из этого, было принято решение о разработке комбинированного лекарственного препарата для лечения ВИЧ-инфекции на основе фосфазида и ламивудина.

[1]НИОТ – нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы транскриптазы ВИЧ.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ФОСФАЗИДА И ЛАМИВУДИНА

В настоящее время согласно рекомендациям ICH (Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для человека) для препаратов, активные молекулы которых уже разработаны и изучены, применяется концепция, в основе которой лежит глубокое понимание свойств препарата с точки зрения возможных рисков для пациента, и основные усилия разработчика направлены на улучшение его качества в ходе производственного процесса [12].

В разрезе фармацевтической разработки комбинированного лекарственного препарата, действующие вещества которого хорошо изучены, безопасны, эффективны, а их комбинация применяется в медицинской практике в виде монопрепаратов, можно выделить следующие важные этапы [12]:

1. Выбор действующих веществ.
2. Выбор лекарственной формы.
3. Выбор вспомогательных веществ.
4. Определение показателей качества готовой лекарственной формы (ГЛФ).
5. Разработка технологии производства ГЛФ, включая методы контроля качества.
6. Проведение доклинических испытаний.
7. Проведение клинических испытаний.

1. Выбор действующих веществ

1.1. Физико-химические свойства действующих веществ.

Ламивудин, 4-амино-1-[(2*R*,5*S*)-2-(гидроксиметил)-1,3-оксатиолан-5-ил]пиримидин-2(1Н)-он, – белый или почти белый кристаллический порошок, без запаха, растворим в воде, умеренно растворим в метаноле, мало растворим в этаноле 96%.

Фосфазид, 3′-азидо-3′-дезокситимидин-5′-фосфонат натрия, – белый или белый с желтоватым оттенком порошок с характерным запахом, разлагается на свету, обладает высокой гигроскопичностью, очень легко растворим в воде, умеренно растворим в этаноле 95%.

1.2. Фармакологические свойства действующих веществ.

Фосфазид и ламивудин являются высокоэффективными избирательными ингибиторами обратной транскриптазы ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Фосфазид является модифицированным аналогом природного нуклеозида тимидина. Ламивудин является синергистом фосфазида в отношении угнетения репликации ВИЧ.

Фосфазид и ламивудин, проникнув в инфицированную клетку, последовательно метаболизируются внутриклеточными киназами до 5′-трифосфатов (ТФ) – азидотимидина-ТФ и ламивудина-ТФ, которые являются субстратами для обратной транскриптазы ВИЧ и конкурентными ингибиторами этого фермента. Противовирусная активность препаратов обусловлена преимущественно включением их монофосфатной формы в цепь вирусной ДНК, в результате чего происходит разрыв цепи и остановка воспроизведения вирусных частиц. Азидотимидина-ТФ и ламивудина-ТФ обладают значительно меньшим сродством к ДНК-полимеразам человеческих клеток [13, 14].

1.3. Опыт клинического применения фосфазида и ламивудина.

Описанные ниже работы по изучению совместного применения фосфазида и ламивудина в клинической практике не являются единичными и приводятся в качестве примеров.

1.3.1. В 2008–2009 гг. на базе Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями был проведен сравнительный анализ эффективности и безопасности схем АРВТ у 46 больных ВИЧ-инфекцией. [15] Целью проводимого исследования было изучение клинической эффективности трехкомпонентной антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции с применением фосфазида.

Для проведения сравнительного анализа пациенты были разделены на 2 группы. 1-ю группу наблюдения составили 18 больных ВИЧ-инфекцией, получавших АРВТ, включающую в качестве нуклеозидной основы Никавир® (фосфазид) и Эпивир® (ламивудин) в сочетании с ненуклеозидным препаратом Стокрин® (эфавиренз) или ингибитором протеазы (атазанавиром) или комбинированным препаратом Калетра® (лопинавир + ритонавир). Во 2-ю группу сравнения было включено 28 пациентов, получавших в качестве нуклеозидной основы препарат Комбивир® (зидовудин + ламивудин) в сочетании с ненуклеозидным препаратом Стокрин® (эфавиренз), причем больные 1-й группы наблюдения отличались более тяжелым состоянием по основному, сопутствующим и вторичным диагнозам по сравнению с ВИЧ-инфицированными пациентами 2-й группы.

Полученные результаты позволили считать эффективными обе схемы АРВТ для лечения ВИЧ-инфекции. Снижение вирусной нагрузки происходило быстрее в первой группе. Основными показателями эффективности проводимой терапии являлись снижение или отсутствие прогрессирования симптомов ВИЧ-инфекции и вторичных заболеваний уже через

12 недель лечения в обеих группах. Эта тенденция сохранялась до конца исследования (48 недель), что подтверждает эффективность обеих применяемых схем лечения, однако в случае выявления у пациентов анемии, гранулоцитопении или сопутствующих заболеваний, таких как хронический гепатит С или туберкулез, схема с включением зидовудина и ламивудина в качестве нуклеозидной основы становится неприемлемой [15].

1.3.2. В Нижегородском областном Центре СПИД в 2013 г. [16] проведено исследование эффективности и безопасности применения фосфазида у 47 пациентов в альтернативных схемах антиретровирусной терапии. Все пациенты получали стандартную схему, состоящую из двух НИОТ и одного ННИОТ[1]. При этом 37 больным в качестве нуклеозидной основы назначался Комбивир® (зидовудин + ламивудин), а 11 – Зерит® (ставудин) и Эпивир® (ламивудин). Из ННИОТ применялся Стокрин® (эфавиренз).

Причиной изменений схемы первого ряда, основу которой составляли препараты зидовудина и ставудина, являлось развитие побочных явлений, таких как анемия, тромбоцитопения, тромбоцитоз, липодистрофия, полинейропатия. При замене препаратов первого ряда на фосфазид сохранилась положительная динамика снижения уровня вирусной нагрузки, не было зафиксировано побочных явлений, требующих замены схемы, а уровень ферментов, свидетельствующих о гепатотоксичности при приеме зидовудина и ставудина, достиг нормы в течение 12 месяцев после изменения схемы [16].

1.3.3. В Санкт-Петербургском центре СПИД в 2012 г. [17] была проведена комплексная оценка 567 пациентов с тяжелым иммунодефицитом, находящихся под диспансерным наблюдением и получающих фосфазид в составе антиретровирусной терапии. Из контрольной группы, отобранной по случайному принципу, 130 пациентов получали в качестве нуклеозидной основы фосфазид и ламивудин. В ходе проведенного исследования такая комбинация показала хорошую иммунологическую и вирусологическую активность, а побочные эффекты, требующие ее замены, наблюдались в 13,2% случаев. Появление побочных эффектов при применении аналогичных препаратов встречается в среднем в диапазоне от 10% до 25% и зависит от тяжести заболевания, схемы лечения, приверженности к терапии и приема психоактивных веществ [17].

1.3.4. В 2012 г. были опубликованы результаты сравнительного исследования эффективности и безопасности лечения хронического гепатита С (ХГС) пегилированным интерфероном (ПегИФН) и рибавирином (РБВ) у 81 больного, получающего фосфазид или абакавир в схемах АРВТ [18]. Целью данного исследования было определение частоты вирусологического и биохимического ответа, а также частоты и выраженности гематологических отклонений в течение терапии ХГС ПегИФН и рибавирином у больных с ВИЧ-инфекцией в зависимости от комбинации препаратов из группы НИОТ в составе схемы АРВТ.

В зависимости от схемы АРВТ пациенты были разделены на 2 группы: 1-я группа (50 человек) – в состав схемы АРВТ был включен фосфазид; 2-я группа (31 человек) – получали абакавир. Кроме того, в составе схемы АРВТ все пациенты получали ламивудин в сочетании с эфавирензом или ингибитором протеазы ВИЧ. Выбор эфавиренза или ингибитора протеазы зависел от исходного уровня аланинаминотрансферазы.

О безопасности как схем АРВТ, так и схем терапии ХГС (ПегИФН + РБВ) судили по изменению показателей периферической крови (уровень гемоглобина, количество нейтрофилов и тромбоцитов), оценку которых в данном исследовании проводили до, через 4, 12 недель после начала терапии ХГС, после завершения курса лечения и спустя 24 недели.

Применение в составе схемы АРВТ препаратов фосфазида, ламивудина и эфавиренза позволило достичь максимальной частоты устойчивого вирусологического ответа – 76,2%. При использовании в составе схем АРВТ препарата фосфазид (по сравнению с абакавиром) как в сочетании с эфавирензом, так и с ингибитором протеазы снижение абсолютного количества CD4+-лимфоцитов в процессе терапии ХГС было менее выраженным. Более того, у больных, получавших фосфазид, через 6 месяцев после завершения курса терапии ХГС количество CD4+-лимфоцитов восстановилось до исходных значений. Применение фосфазида в комбинации с ламивудином и эфавирензом (или ингибитором протеазы) может быть назначено пациентам с ВИЧ-инфекцией и ХГС, которым необходима терапия ПегИФН и РБВ, безопасно, оно не оказывает существенного влияния на показатели периферической крови [18].

1.3.5. В 2010 г. на базе Санкт-Петербургского Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями и специализированного отделения по лечению туберкулеза у ВИЧ-инфицированных Городской туберкулезной больницы №2 г. Санкт-Петербурга были получены данные о результатах применения фосфазида у больных с ВИЧ-инфекцией и туберкулезом [19]. Целью данного исследования являлось изучение опыта применения фосфазида в составе ВААРТ для лечения больных с ВИЧ-инфекцией и туберкулезом.

Пациенты были разделены на две группы: 1-я получала в качестве нуклеозидной основы фосфазид в

[1]ННИОТ – ненуклеозидные ингибиторы транскриптазы ВИЧ.

сочетании с ламивудином или диданозином, 2-я группа получала препарат Комбивир® (зидовудин + ламивудин), третьим препаратом в обеих группах был эфавиренз. По клиническим характеристикам (формы туберкулезного процесса, стадии ВИЧ-инфекции), возрастным, гендерным особенностям, длительности течения заболевания группы достоверно не отличались. Минимальный срок наблюдения составлял 24 недели. Оценивали вирусологическую и иммунологическую эффективность лечения, а также его безопасность и переносимость.

Через 48 недель терапии иммунологическая эффективность оставалась хорошей и также не отличалась в двух группах. Был зафиксирован прирост CD4+-лимфоцитов, однако применение комбинации, включающей зидовудин, приводило к угнетению гемопоэза, которое наблюдалось с максимальной интенсивностью на 2-м и 3-м месяцах от начала ВААРТ. Применение же фосфазида не приводило к значимым нарушениям уровня клеток крови. Кроме того, за 6 месяцев лечения в группе пациентов, получавших фосфазид, в 54,2% случаев регистрировали выраженную клинико-рентгенологическую динамику туберкулезного процесса, в 8,3% – стабилизацию течения туберкулеза, у 77,8% больных прекратилось бактериовыделение. Таким образом, применение фосфазида в составе различных схем АРВТ (в том числе и с включением ламивудина) у пациентов с ВИЧ-инфекцией и туберкулезом показало положительный терапевтический эффект на фоне редкого возникновения нежелательных явлений [19].

2. Выбор лекарственной формы

Учитывая вышеописанный клинический опыт применения комбинации фосфазида и ламивудина, позволяющий судить об эффективности и безопасности их совместного применения, следующей стадией разработки является выбор лекарственной формы, который обусловлен прежде всего фармакокинетическими параметрами активных веществ. Ввиду того, что фосфазид и ламивудин хорошо всасываются из ЖКТ, была выбрана пероральная лекарственная форма – таблетка, покрытая пленочной оболочкой.

Использование твердой дозированной пероральной лекарственной формы предпочтительно по ряду небезызвестных всем причин, но в данном случае акцент был сделан на таких особенностях высокоактивной антиретровирусной терапии, как прием не менее трех препаратов одновременно и пожизненное лечение. Удобство приема препарата в данном случае играет важнейшую роль. Сочетание в одной лекарственной форме двух действующих веществ позволяет сделать более удобным прием антиретровирусных препаратов, что значительно повышает приверженность к терапии ВИЧ-инфекции у больных, принимающих такие комбинированные препараты.

Ввиду того, что выбор вспомогательных веществ, определение показателей качества ГЛФ, разработка технологии производства ГЛФ, включая методы контроля качества, являются параллельными взаимосвязанными процессами, они были разделены на следующие этапы и стадии с целью получения ГЛФ, снабженной полным комплектом документации для подачи в регуляторные органы:

Этап 1. Лабораторная технология

Стадия 1. Изучение физико-химических свойств субстанций.

Стадия 2. Подбор состава лекарственной формы и наработка лабораторных образцов.

Стадия 3. Завершение разработки лабораторной технологии.

Этап 2. Методы контроля качества

Стадия 1. Разработка методики количественного определения действующих веществ.

Стадия 2. Разработка и валидация нефармакопейных аналитических методик по показателям «Подлинность», «Посторонние примеси», «Растворение». Отработка фармакопейных методик.

Стадия 3. Разработка проекта ФСП, включая разделы «Маркировка», «Упаковка», и проекта макетов первичной и вторичной (потребительской) упаковки.

Этап 3. Опытно-промышленная технология

Стадия 1. Подбор режимов работы оборудования по параметрам, полученным в ходе разработки лабораторной технологии.

Стадия 2. Отработка режимов работы оборудования, описание процесса производства и его валидация.

Стадия 3. Завершение разработки опытно-промышленной технологии.

Этап 1. Лабораторная технология

На этапе разработки лабораторной технологии проводилось изучение свойств субстанций с целью установления отсутствия их химического взаимодействия и подбор вспомогательных компонентов таблетки. Ввиду того, что все порошкообразные вещества – это кристаллические вещества или агломераты аморфных частиц, которые имеют различные физические свойства – сыпучесть, насыпная плотность, прессуемость и др., от них зависит не только технология получения готового продукта, но также и биодоступность препарата, время его распадаемости и растворения.

Основными стадиями данного этапа являются:

Стадия 1. Изучение физико-химических свойств субстанций.

Изучали такие свойства, как химическое взаимодействие при ускоренном хранении, форма кристаллов или их отсутствие, сыпучесть, насыпная плотность, фракционный состав, скорость растворения в воде и 0,1Н растворе хлористоводородной кислоты.

Стадия 2. Подбор состава лекарственной формы и наработка лабораторных образцов.

В зависимости от того, какие результаты были получены на первой стадии, определяли способ получения массы для таблетирования. В данном случае был выбран метод сухого гранулирования ввиду высокой гигроскопичности субстанций.

Учитывая тот факт, что содержание действующих веществ превышает 500 мг на одну таблетку, а ее размеры и форма крайне важны при пожизненном применении, была поставлена задача максимально оптимизировать технологию производства и добиться наиболее низкого содержания вспомогательных веществ. В этой связи оказалось невозможным использование стандартных приемов добавления лубрикантов и антифрикционных веществ, и был проведен поиск инновационных решений, применяемых в этой области.

Результатом данного поиска явилось применение современных и усовершенствованных вспомогательных веществ:

– целлюлозы микрокристаллической силицированной (готовый продукт, выпускаемый по запатентованной технологии путем равномерного нанесения кремния диоксида коллоидного на поверхность микрокристаллической целлюлозы), что позволило снизить массу таблетки, сохранить прессуемость при хороших показателях сыпучести, а также обеспечить однородность смеси и, как следствие, оптимальную распадаемость готовой лекарственной формы;

– натрия стеарилфумарата – высокоэффективного лубриканта, обладающего свойствами ускорения распадаемости и растворения таблетки, не придающего неприятного металлического привкуса, обеспечивающего хорошую прочность таблетки, снижающего необходимую силу выталкивания и малочувствительного к увеличению времени перемешивания, что, в свою очередь, позволило объединить финальную стадию опудривания массы для таблетирования с ее гомогенизацией.

Ввиду гигроскопичности активных веществ при выборе покрытия таблетки оболочкой была поставлена задача – подобрать оптимальные условия процесса покрытия в части температуры нанесения пленочной оболочки, концентрации ее в суспензии и процентного соотношения массы оболочки к массе ядра таблетки. Также подбирали покрытие с гидрофобными свойствами, чтобы предотвратить поглощение влаги таблеткой при ее хранении вне блистера перед приемом, например в таблеточнице. В результате выбор пал на готовое покрытие на основе гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), которое в ходе испытаний показало полное соответствие предъявляемым требованиям.

Также на этапе лабораторной технологии были подобраны материалы упаковки.

Стадия 3. Завершение разработки лабораторной технологии.

Результатом разработки лабораторной технологии являются:

– лабораторный регламент получения готовой лекарственной формы;

– отчет о проведении лабораторных экспериментов с указанием состава лекарственного средства в процентном соотношении, рекомендации по времени и очередности смешивания компонентов, технологических свойств массы для таблетирования и таблеток, таких как фракционный состав, сыпучесть, угол естественного откоса, прочность таблеток, истираемость, скорость и время нанесения покрытия, распадаемость таблеток и их форма;

– рекомендации к разработке опытно-промышленной технологии готовой лекарственной формы.

Этап 2. Методы контроля качества

Цель фармацевтической разработки – создать препарат соответствующего качества и обосновать процесс его производства, чтобы выпускать продукт с заданными функциональными характеристиками. Поскольку качество не может быть полностью проверено в создаваемом препарате, его необходимо заложить при разработке и обеспечить при производстве. Перед началом фармацевтической разработки должен быть определен предварительный набор показателей качества лекарственного препарата и соответствующих норм, достижение которых является гарантией желаемого качества препарата с учетом эффективности и безопасности.

Разработка методов контроля качества начинается на этапе разработки лабораторной технологии [26]. Комплекс параметров качества на этом этапе может включать контроль показателей, связанных с действующим веществом и вспомогательными веществами, взаимодействием препарата как с материалами упаковки, так и с условиями окружающей среды и функционирования оборудования, а также определение частоты мониторинга и контроля в процессе производства. В это же время проводят испытания стабильности препарата в стрессовых условиях, что позволяет

изучить влияние факторов окружающей среды и дает детальные сведения о профиле примесей и поведении лекарственного препарата при хранении и транспортировке в условиях, выходящих за границы норм, при которых обеспечивается стабильность препарата на протяжении заявляемого срока годности.

Стадия 1. Разработка методики количественного определения действующих веществ.

Разработка методики количественного определения действующих веществ методом ВЭЖХ проводилась в процессе разработки лабораторной технологии. К моменту завершения работ по изучению стабильности и написания лабораторного регламента методика была разработана и валидирована.

Стадия 2. Разработка и валидация нефармакопейных аналитических методик по показателям «Подлинность», «Посторонние примеси», «Растворение». Отработка фармакопейных методик.

Целью второй стадии разработки методов контроля качества являлось экспериментальное доказательство пригодности методик для определения подлинности, посторонних примесей и растворения методом ВЭЖХ. Определялись валидационные показатели, такие как специфичность, линейность, сходимость, внутрилабораторная прецизионность, правильность, а также критерии приемлемости. Испытания по показателю «Растворение» проводились в соответствии с ОФС 42-0003-04, а количество фосфазида и ламивудина, перешедшее в раствор, определялось методом ВЭЖХ.

Для подготовки к отработке опытно-промышленного регламента определялись методы контроля качества сырья и вспомогательных материалов.

Отработка фармакопейных методик, специфичных для лекарственной формы «таблетки», таких как «Однородность массы», «Микробиологическая чистота», определение содержания кремния диоксида коллоидного, а также выбор условий хранения и срока годности препарата были предусмотрены данной стадией.

Стадия 3. Разработка проекта ФСП, включая разделы «Маркировка», «Упаковка», и проекта макетов первичной и вторичной (потребительской) упаковки.

На данной стадии был подготовлен проект фармакопейной статьи предприятия, включающий все показатели качества, нормы по которым были установлены и обоснованы на этапах лабораторной технологии и при отработке режимов работы оборудования, описании процесса производства и его валидации на этапе опытно-промышленной технологии. Также была разработана первичная и вторичная упаковка (блистер из пленки ПВХ/ПВДХ и фольги алюминиевой; пачка картонная), учитывающая физико-химические свойства готовой лекарственной формы.

Этап 3. Опытно-промышленная технология

На этапе разработки опытно-промышленной технологии учитываются все рекомендации, полученные при разработке лабораторной технологии, с целью переноса процесса на промышленное оборудование и определения критических контрольных точек для проведения валидации процесса. Иными словами, опытно-промышленная технология – это этап, на котором необходимо получить полное представление о том, каким будет процесс производства в итоге, т.е. учесть все аспекты разработки препарата, включающие методы внутриоперационного и межоперационного контроля, методы выпускающего контроля качества, а также доклинические и клинические исследования и регистрационные действия.

Стадия 1. Подбор режимов работы оборудования по параметрам, полученным в ходе разработки лабораторной технологии.

На данной стадии решались задачи по проверке режимов смешивания ингредиентов в процессе получения массы для таблетирования, подбор оптимального времени опудривания и гомогенизации полученной массы. Проведение процесса таблетирования и определение наилучших параметров свойств массы для таблетирования, таких как насыпная плотность, фракционный состав, сыпучесть. Были подобраны режимы обеспыливания и покрытия таблеток оболочкой на промышленной установке, отработаны режимы фасовки таблеток в контурную ячейковую упаковку (блистер), а также определены критерии оценки для методов внутриоперационного и межоперационного контроля.

Предварительно на всем оборудовании, планируемом к использованию для производства разрабатываемого препарата, были проведены работы по квалификации стадии PQ с целью установления возможности работы оборудования в соответствии со спецификацией при производстве данного продукта. Было установлено, что оборудование выходит на указанные в спецификациях рабочие режимы.

Стадия 2. Отработка режимов работы оборудования, описание процесса производства и его валидация.

На данной стадии была проведена отработка режимов процесса производства, установленных и описанных на первой стадии. В ходе испытаний была проведена валидация процесса, которая показала, что режимы подобраны верно и процесс воспроизводим. Для статистической обработки результатов, полученных в ходе проведения валидации процесса, были применены статистические методы с использованием карт Шухарта, представленных ниже, на примере валидации процесса производства таблеток-ядер (рисунок 3).

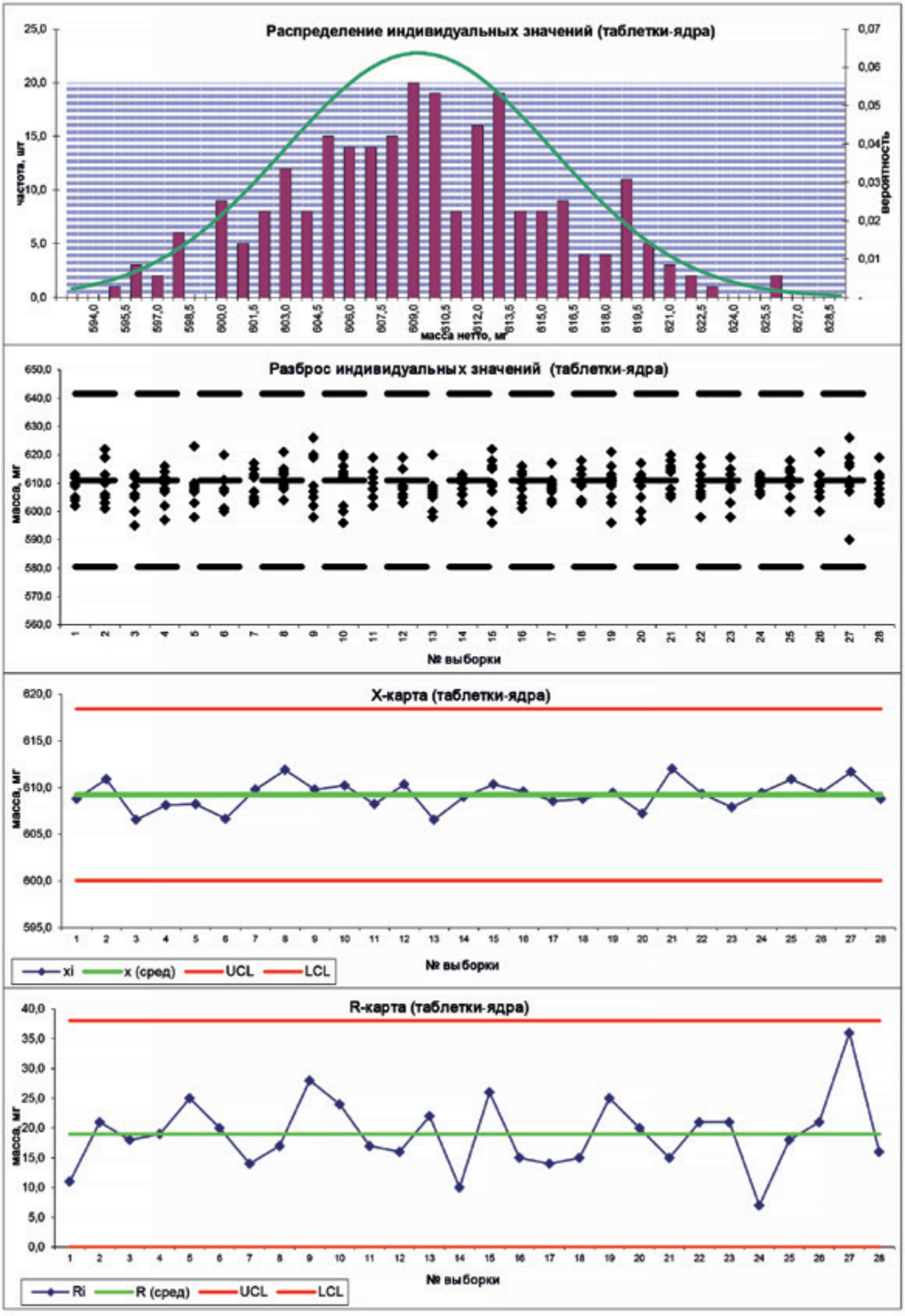


Рисунок 3. Статистический анализ стабильности процесса таблетирования

На графиках приведены данные по распределению значений масс таблеток в соответствии с законом нормального распределения и распределение их индивидуальных значений, из которых следует, что фактические значения масс таблеток в процессе таблетирования стремятся к заданному (номинальному) значению и не выходят за пределы допустимых отклонений при прессовании.

X-карты показывают распределение средних значений подгрупп в генеральной совокупности, а R-карты – разницу между максимальными и минимальными значениями внутри подгрупп выборки, что соответствует критерию стабильного процесса и дает возможность утверждать, что процесс стабилен и вероятное возникновение продукции, не соответствующей требованиям спецификации, на один миллион таблеток составляет менее 0,0066%. Для составления данного отчета использовался ГОСТ Р серии 50779 [20–25].

На основании данных, полученных по X- и R-картам, рассчитываются индексы возможности процесса. Для анализа возможностей процесса используют четыре индекса (таблица 1).

Таблица 1.

Анализ возможностей процесса таблетирования препарата Фосфаладин®

N	252
X_{ocp}	609,2
R_{cp}	19,0
UCL	381,0
LCL	370,0
Ном.	611,0
USL	641,6
LSL	580,5
δпроц.	6,3973
Cp	1,59
Cpk	1,50

Примечание: C_p и C_{pk} – для статистически стабильных процессов; C_p – индекс воспроизводимости процесса, оценивающий возможность соответствовать техническому допуску без учета положения среднего значения и применяемый для стабильных по разбросу процессов; C_{pk} – индекс воспроизводимости процесса, оценивающий возможность соответствовать техническому допуску с учетом фактического положения среднего значения и применяемый для стабильных и по разбросу, и по настройке процессов; $C_{pk}=C_p$ (1-k), где k – показатель того, насколько хорошо процесс настроен на заданное (номинальное) значение показателя качества; P_p и P_{pk} – для процессов, статистическая стабильность которых не подтверждена.

Индекс процесса C_p – используется для оценки ширины разброса данных по сравнению с диапазоном заданных (номинальных) значений (по данному показателю качества) без учета центрирования процесса.

Если C_p=1, то, возможно, процесс воспроизводим (если центрирован по номинальному значению), если C_p<1, то требуются улучшения процесса, связанные с уменьшением разброса анализируемого параметра.

Для фармацевтической промышленности значение C_p должно быть не менее 1,33 для действующего производства и 1,50 – для нового процесса, это означает, что процесс стабилен и воспроизводим.

Индекс процесса C_{pk} – отображает то, насколько большое количество продукции находится за верхней или нижней границей требований в зависимости от того, с какой стороны дефектной продукции больше.

Если $C_p=C_{pk}$, то процесс центрирован относительно номинального значения показателя качества и распределение значений параметра симметрично относительно номинального значения.

Ввиду соответствия индексов C_p и C_{pk} показателям стабильного процесса расчет индексов P_p и P_{pk} не требуется [20–25].

Стадия 3. Завершение разработки опытно-промышленной технологии.

Результатом разработки опытно-промышленной технологии являются:

– опытно-промышленный регламент получения готовой лекарственной формы;

– отчет о проведении работ по отработке режимов работы оборудования, технологических свойствах массы для таблетирования и таблеток, таких как фракционный состав, сыпучесть, угол естественного откоса, прочность таблеток, истираемость, скорость и время нанесения покрытия, распадаемость таблеток и др.;

– рекомендации к разработке промышленной технологии готовой лекарственной формы в части оптимизации процесса производства и снижения уровня потерь;

– проект фармакопейной статьи предприятия.

Для проведения клинических исследований необходимо изготовить 3 промышленные серии, для которых также следует провести валидацию процесса производства.

Разработку и проведение доклинических и клинических испытаний комбинированного лекарственного препарата целесообразно рассмотреть с позиции регуляторных требований [27–33].

ОСОБЕННОСТИ ПРЕДОСТАВЛЕНИЯ ДАННЫХ О ДОКЛИНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ДОСЬЕ С ЦЕЛЬЮ ЕГО ГОСУДАРСТВЕННОЙ РЕГИСТРАЦИИ

Нормативную базу при доклинической разработке комбинированных лекарственных препаратов в настоящее время составляют: Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», Ч. 1, а также «Руководство по экспертизе лекарственных средств», Т. III.

В качестве методической базы можно использовать рекомендации международного статуса: EMA. Guideline on the non-clinical development of fixed combination of medicinal products (2008); EMA. Guideline on the non-clinical documentation for mixed marketing authorisation applications (2005); EMA. Guideline on the investigation of drug interactions (2012); ICH M3 (R2). Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (2009).

Комбинация фосфазида и ламивудина классифицируется как фиксированная, оригинальная (новая) комбинация действующих веществ, применяющихся в стандартных схемах комбинированной фармакотерапии, т.е. возможность комбинирования предусмотрена инструкцией по применению.

Целью доклинических исследований препарата являлась не только оценка профиля эффективности и безопасности комбинации, но и изучение свойств разрабатываемой комбинации, а также сравнение свойств комбинации со свойствами монопрепаратов и выявление эффектов взаимодействия (например, потенцирование действия одного из компонентов за счет синергизма).

Поскольку данная комбинация не является воспроизведенной, а данные о взаимодействии референтных препаратов в одной лекарственной форме отсутствуют, компанией-разработчиком «АЗТ ФАРМА К.Б.» были проведены доклинические исследования комбинированного препарата фосфазида и ламивудина в полном объеме.

Далее приводится перечень исследований, проведенных для формирования блока доклинической документации.

Доклиническая фармакология. Целью исследования являлось изучение эффективности комбинированного средства, специфической активности комбинации ламивудина и фосфазида и исследование синергического эффекта данной комбинации.

Исследования эффективности препарата проводились на модели клеток человека, инфицированных ВИЧ-1 (острая инфекция). На данном этапе изучению подлежали противовирусное и цитотоксическое действие лекарственных средств.

Полученные результаты исследования цитотоксического и противовирусного действия как отдельных действующих веществ, так и их комбинации показали, что исследуемые препараты не проявляли цитотоксического действия на клетки, обладали выраженным противовирусным действием в отношении вируса иммунодефицита человека. Также был обнаружен аддитивный и синергидный противовирусный эффект.

Фармакокинетика и метаболизм препарата у животных. Целью исследования являлось изучение фармакокинетических параметров комбинации и ее биодоступности относительно назначения референтных монопрепаратов.

Данный этап позволил обосновать режим дозирования разрабатываемого препарата.

Токсикология. Программа токсикологического исследования включала изучение токсичности и переносимости комбинации субстанций фосфазида и ламивудина в соотношении 8:3 и готового комбинированного лекарственного препарата на мышах, крысах и собаках. Кроме того, было проведено изучение потенциальных мутагенных, эмбриотоксических, тератогенных, аллергизирующих и иммунотоксических свойств препарата, а также исследовано его влияние на репродуктивную функцию.

Анализ результатов токсикологического исследования позволил обосновать дозировку разрабатываемого препарата.

Таким образом, программа доклинических исследований разрабатываемой комбинации, основанная на полноценном научном обосновании ее разработки, позволила судить о токсических свойствах компонентов, их возможном взаимодействии с выявлением эффекта взаимодействия в сравнении с отдельными компонентами и сделала возможной оценку отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения комбинированного лекарственного препарата в медицинской практике [27–30].

Нормативную базу при клинической разработке комбинированных лекарственных препаратов в настоящее время составляют: Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и «Руководство по экспертизе лекарственных средств», Т. III.

В качестве методической базы можно использовать рекомендации международного статуса: EMA. Guideline on clinical development of fixed combination medicinal products (2009); EMA. Guideline on clinical development of fixed combination medicinal products (draft, 2015), взамен руководства 2009 г.; FDA. Guidance for Industry Codevelopment of Two or More New Investigational Drugs for Use in Combination (2013); WHO. Guidelines for registration of fixed-dose combination medicinal products (2005). Также применимы национальные и международные рекомендации по диагностике и лечению целевого заболевания и национальные и международные рекомендации по применению действующих веществ, входящих в состав комбинированных лекарственных препаратов.

Планирование клинического исследования также основывается на классификации изучаемой комбинации. Истинные комбинированные препараты, содержащие фиксированные комбинации действующих веществ, характеризуются следующими признаками:

– единая лекарственная форма;

– заданное содержание активных компонентов;

– одновременный прием всех компонентов;

– невозможность случайной или произвольной отмены одного из компонентов.

Поскольку комбинированный ЛП фосфазида и ламивудина не является воспроизведенным, разработчиком препарата было предусмотрено выполнение следующих регуляторных ожиданий для его регистрации:

– существует высокая потребность практической медицины в предложенном комбинированном ЛП;

– состав действующих веществ комбинированного ЛП обоснован с фармакологической и клинической точек зрения;

– существенный вклад каждого из действующих веществ в общий терапевтический эффект комбинированного ЛП подтвержден результатами доклинических и клинических исследований;

– благоприятное отношение пользы к риску комбинированного ЛП подтверждено результатами доклинических исследований и должно быть подтверждено результатами сравнительных клинических исследований, которые в настоящее время близки к завершению.

Также разработчиком комбинированного препарата в процессе подготовки введения его в обращение предусмотрено, что опыт пострегистрационного применения комбинации будет рассматриваться в первую очередь при экспертизе досье препарата с целью подтверждения его государственной регистрации после 5 лет обращения препарата.

Для комбинированного препарата фосфазида и ламивудина в настоящее время проводится предусмотренное требованиями законодательства сравнительное исследование биоэквивалентности на здоровых добровольцах. Целью клинического исследования является оценка безопасности, биодоступности и фармакокинетики комбинированного препарата в сравнении с референтными монопрепаратами фосфазида и ламивудина. Для достижения поставленной цели необходимо выполнение следующих задач:

– оценка фармакокинетических параметров и относительной биодоступности комбинированного препарата по сравнению с референтными монопрепаратами;

– оценка биоэквивалентности исследуемого ЛП препаратам сравнения на основе статистического анализа фармакокинетических данных;

– оценка переносимости и безопасности исследуемого препарата в сравнении с референтными монопрепаратами фосфазида и ламивудина.

Подытоживая, можно определить следующие важнейшие аспекты клинического изучения разрабатываемой комбинации. Препарат должен быть востребован практической медициной, состав действующих веществ должен быть рационально обоснован со всех точек зрения (но не только с позиции маркетинга), а при разработке клинического изучения комбинированного лекарственного препарата необходимо учитывать как фармакологические свойства действующих веществ, так и особенности целевого заболевания [31–33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Осознание эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции в Российской Федерации и низкий охват лечением инфицированных пациентов позволяет сделать вывод, что внедрения стандартов лечения, предусматривающих применение современных схем антиретровирусной терапии на основе дорогостоящих импортных препаратов, недостаточно для улучшения эпидемиологической ситуации в целом [1–3].

Текущий уровень финансирования закупок антиретровирусных препаратов не позволяет в ближайшее время охватить лечением не менее чем 60% ВИЧ-инфицированных пациентов, что, по мнению министра здравоохранения РФ, позволило бы достигнуть к 2023 г. регресса заболевания [3], а значительное увеличение доли антиретровирусных препаратов российского производства планируется только к 2020 году [5]. Таким образом, с позиции фармацевтической промышленности на первый план в борьбе с распространением заболевания выходит разработка и введение в оборот эффективных, безопасных, а главное – доступных российских препаратов для лечения ВИЧ-инфекции в рамках федеральной целевой программы «Фарма-2020», позволяющих обеспечить бесперебойную поставку антиретровирусных препаратов для профилактики и лечения ВИЧ-инфекции во все субъекты Российской Федерации.

Разработанный компанией «АЗТ ФАРМА К.Б.» комбинированный антиретровирусный лекарственный препарат на основе фосфазида и ламивудина полностью укладывается в выбранную на государственном уровне стратегию противодействия распространению ВИЧ-инфекции. Оба действующих вещества хорошо изучены, безопасны, эффективны, широко применяются в схемах терапии ВИЧ-инфекции и входят в перечень ЖНВЛП. Химический синтез и производство фармацевтической субстанции фосфазида осуществляется на территории Российской Федерации. В мае 2015 года была внесена в государственный реестр лекарственных средств фармацевтическая субстанция ламивудина, химический синтез и производство которой налажено отечественным фармацевтическим предприятием. В настоящее время клинические испытания комбинированного лекарственного препарата близки к завершению, а планируемый срок его введения в обращение запланирован на начало 2017 г.

Для изготовления комбинированного лекарственного препарата на территории КП «Технопарк «Строгино»[1] была создана высококлассная производственная площадка по выпуску твердых дозированных лекарственных форм с целью увеличения производственных мощностей и расширения научно-исследовательской базы. Инфраструктура технопарка позволяет обеспечить полный цикл разработки, производства и контроля качества лекарственных препаратов для лечения и профилактики вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в соответствии с национальными стандартами качества и организации фармацевтического производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Справка «ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2014 г.» (подготовлена в Федеральном научно-методическом центре по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).
2. Справка «ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 1 ноября 2015 г.» (подготовлена в Федеральном научно-методическом центре по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).
3. Стенограмма заседания Правительственной комиссии по вопросам охраны здоровья граждан. URL: http://government.ru/news/20196/ (дата обращения 20.01.2016).
4. А.Ф. Хохлов, Б.В. Бровченко, А.А. Смирнов. Применение оригинального отечественного лекарственного препарата для терапии ВИЧ-инфекции в условиях импортозамещения // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4 (13). С. 182–186.
5. Приказ Минпромторга России от 31 марта 2015 г. № 656 «Об утверждении отраслевого плана мероприятий по импортозамещению в отрасли фармацевтической промышленности Российской Федерации».
6. Приказ Министерств здравоохранения РФ о разрешении применения лекарственных средств № 358 от 05.10.1999 г.
7. Н.В. Сизова, З.В. Губа, С.Э. Торопов, Н.Г. Захарова, А.Г. Рахманова. Фосфазид – отечественный препарат для лечения ВИЧ. Второе рождение // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2012. Т. 4. № 2. С. 45–54.
8. ВИЧ-инфекция и СПИД: национальное руководство / Под ред. акад. РАМН В.В. Покровского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. С. 25, 33, 322–324, 336, 489, 580, 584.
9. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению ВИЧ-инфекции у взрослых. Национальная вирусологическая ассоциация. Профильная комиссия Минздрава России по проблемам диагностики и лечения ВИЧ-инфекции. Утверждены 10 сентября 2013 г.
10. В.В. Покровский, О.Г. Юрин, А.В. Кравченко, В.В. Беляева, В.Г. Канестри, Л.Ю. Афонина, Т.Н. Ермак, Е.В. Буравцова, В.И. Шахгильдян, Н.В. Козырина,

[1]Казенное предприятие «Технопарк «СТРОГИНО» создан в 2007 году правительством Москвы при поддержке Минэкономразвития РФ. Является технопарком полного цикла, состоит в международных организациях IASP и NBIA.

Р.С. Нарсия, В.Н. Зимина, А.В. Покровская, Д.С. Конов, В.В. Конов, М.А. Голиусова, О.С. Ефремова, А.А. Попова. Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013. № 6. С. 18–24.

11. Дж. Бартлетт, Р. Редфилд, П. Фам, А.И. Мазус. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции. Российское издание. – М: ГРАНАТ, 2013. С. 53–56, 273–276.
12. С.Н. Быковский, И.А. Василенко, Н.Б. Демина, И.Е. Шохин, О.В. Новожилов, А.П. Мешковский, О.Р. Спицкий. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. – М. Изд-во Перо, 2015. 528 с.
13. Инструкция по применению лекарственного препарата Эпивир®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 150 мг; МНН действующего вещества – ламивудин (П N014918/02 от 11.12.2008), производитель «Глаксо Оперэйшенс Великобритания Лимитед», Великобритания.
14. Инструкция по применению лекарственного препарата Никавир®, таблетки 200 мг, группировочное название действующего вещества – фосфазид, (Р N003864/01 от 05.02.2010), производитель ООО «АЗТ ФАРМА К.Б., Россия.
15. Е.С. Иванова, Н.Н. Воробьева. Трехкомпонентная антиретровирусная терапия ВИЧ-инфекции с применением фосфазида // Материалы V Международной научной конференции «Онкология – XXI век». Сполетто. 2010. С. 170–174.
16. Г.Ф. Мошкович, С.В. Минаева. Исследование применения фосфазида в альтернативных схемах АРВТ у больных с ВИЧ-инфекцией // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2013. Т. 5. № 4. С. 57–61.
17. Н.В. Сизова, З.В. Губа, Г.А. Ефимов, К.А. Фадеев, М.Ю. Голиусова, Е.В. Степанова. Ретроспективный анализ применения у ВИЧ-инфицированных пациентов с тяжелым иммунодефицитом // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2012. Т. 4. № 4. С. 57–62.
18. А.В. Кравченко, У.А. Куимова, В.Г. Канестри, Н.Ю. Ганкина, Л.В. Серебровская. Применение препарата фосазид в схемах АРВТ у больных с ВИЧ-инфекцией и хроническим гепатитом С, получавших лечение ХГС // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2012. Т. 4. № 2. С. 64–71.
19. А.М. Пантелеев, М.Ю. Голиусова, В.И. Кабанова. Результаты применения фосфазида (никавира) у больных ВИЧ-инфекцией и туберкулезом // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2010. Т. 2. № 2. С. 75–79.
20. ГОСТ Р 50779.0-95. Статистические методы. Основные положения.
21. ГОСТ Р 50779.11-2000 (ИСО 3534-2-93). Статистическое управление качеством. Термины и определения.
22. ГОСТ Р 50779.22-2005 (ИСО 2602:1980). Статистические методы. Статистическое представление данных.
23. ГОСТ Р 50779.44-2001. Статистические методы. Показатели возможностей процессов. Основные методы расчета.
24. ГОСТ Р 50779.40-96 (ИСО 7870-93). Статистические методы. Контрольные карты. Общее руководство и введение.
25. ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91). Статистические методы. Контрольные карты Шухарта.
26. С.Н. Быковский, И.А. Василенко, М.И. Харченко, А.Б. Белов, И.Е. Шохин, Е.А. Дорина. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов. – М. Изд-во Перо, 2014. 674 с.
27. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. – М.: Гриф и К, 2013.
28. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. – М.: Гриф и К, 2013.
29. А.Н. Васильев. Программы доклинической и клинической разработки лекарственных препаратов // Материалы конференции «Фарммедобращение-2015». Москва.
30. А.Н. Васильев, О.В. Астапова. Материалы семинара «Экспертиза лекарственных средств, процедуры и требования к представляемым материалам». Москва. 2015.
31. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. Ч. I. – М.: Гриф и К, 2012.
32. А.Н. Васильев, А.В. Добровольский. Материалы семинара «Экспертиза лекарственных средств, процедуры и требования к представляемым материалам». Москва. 2015.
33. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. III. – М.: Полиграф плюс, 2014.



Rotavapor® R-300

Больше удобства. Больше эффективности. Больше для вас.

Задачи ротационного упаривания не изменились. Изменилось решение. Абсолютно новая система Rotavapor® R-300 упростит вашу жизнь и освободит время:

- Управляйте всеми параметрами процесса с помощью единого интерфейса
- Получайте push-уведомления на ваш смартфон о статусе процесса
- Упаривайте даже пенящиеся образцы без необходимости наблюдения
- Автоматизируйте ваши индивидуальные методики при помощи программируемых SOP

Дистрибьютор

Фармконтракт
группа компаний

+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.com/rotavapor

Quality in your hands

УДК 615.322

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ БЕРЕЗОВЫХ ПОЧЕК

Е.Г. Горелова[1], О.Ю. Кузнецова[1]*, Р.З. Гильманов[1]

1 – ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВПО «КНИТУ»), 420015, Россия, г. Казань, ул. К. Маркса, 68

1 – Federal State Educational Institution of Higher Professional Education Kazan National Research Technological University (VPO «KNRTU»), 68, K. Marx str., Kazan, 420015, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: kuznetsovaolga@mail.ru
Тел.: 8 (843) 231 95 71

Резюме. Проведено экстрагирование березовых почек двумя типами экстрагентов: водой, смесью изопропанол – вода переменного соотношения. Для интенсификации процесса экстракции использовался ультразвук. Оценено влияние ультразвука на качество извлечений при их обработке на различных стадиях ведения процесса. Экспериментальным путем выбраны оптимальные режимы получения извлечений из березовых почек с высоким выходом экстрактивных веществ.

Ключевые слова: извлечения из почек березовых, изопропиловый спирт, ультразвук.

A METHOD FOR PRODUCING AND RESEARCH OF BIRCH BUDS EXTRACTS

E.G. Gorelova[1], O.Yu. Kuznetsova[1]*, R.Z. Gilmanov[1]

Abstract. An extraction of birch buds was made using two types of extractants – with water and mixture of isopropyl alcohol: water with variable ratio. An ultrasound was used to intensify the extraction process. The effect of ultrasound on the quality of the extracts was evaluated on the various stages of the process. Experimentally the optimal mode of obtaining extracts of birch buds with high output of extractive substance was selected.

Keywords: extracts of birch buds, isopropyl alcohol, ultrasound.

ВВЕДЕНИЕ

Народная и официальная медицина издревле используют полезные свойства березы для лечения и профилактики различных заболеваний, поскольку практически все компоненты березы: листья, почки, кора (береста), сок, деготь и т.д. – обладают лекарственными свойствами [1–3].

Перспективным природным сырьем на основе березы для получения галеновых препаратов являются высушенные березовые почки. Их собирают до распускания в зимне-весенний период (январь – апрель). Сбор почек осуществляют с берез двух типов: березы повислой (*Betula pendula* Roth) и березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.), семейство березовых (Betulaceae).

Березовые почки используют в виде настоев и отваров как дезинфицирующее и отхаркивающее средство при бронхитах и трахеитах. Известно мочегонное, антисептическое и желчегонное действие настоев и отваров из березовых почек [1].

Наиболее часто экстрагирование березовых почек проводят водой, этиловым спиртом, петролейным или диэтиловым эфиром. Экстрактивные вещества березовых почек представлены в основном низкомолекулярными веществами (флавоноидами, алкалоидами, сложными эфирами, высшими жирными кислотами, сесквитерпеновыми соединениями, триацилглицеридами, кумаратами сесквитерпеновых спиртов, витаминами С, РР, каротином и др.) [4–7].

В данной работе для экстрагирования березовых почек выбран новый экстрагент, который ранее не использовался для этого сырья.

Цель данного исследования – разработать новый способ получения извлечений из березовых почек и исследовать их физико-химические характеристики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалось аптечное сырье – «Береза, почки – «Фарм-Продукт» Состав: береза повислая, почки измельченные. Фирма-изготовитель – ООО «Фарм-Продукт» (Россия, Алтайский край, г. Барнаул), серия 70515 05/2015. Сырье предварительно измельчалось в фарфоровой ступке до однородной массы.

В качестве экстрагента применялись дистиллированная вода и смесь изопропанол – вода в различных соотношениях (80:20; 70:30 и 60:40).

Соотношение сырье : экстрагент составляло 1:10.

Использовался изопропиловый спирт марки х.ч.

Определение сухого остатка сырья осуществлялось по [3, 8]. Определение содержания витамина С проводили по [9].

Обработка ультразвуком проводилась на приборе «Сапфир УЗВ-0,8 ТЦ» (Россия) с рабочей частотой 35 кГц, мощностью генератора 50 Вт, длительностью обработки 3 мин, объемом обрабатываемого образца 50 мл.

Результаты экспериментов обработаны с помощью программы «Статистика-6» и приведены в таблице, значение доверительной вероятности P=0,95, n=3 (n – объем выборки или количество экспериментов).

Физико-химические характеристики извлечений из березовых почек приведены в таблицах 1–3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве перспективного экстрагента для извлечения экстрактивных веществ из березовых почек был выбран изопропиловый спирт. Традиционно экстрагирование березовых почек ведут водой или этиловым спиртом, поэтому на первом этапе нашего исследования были для сравнения получены и изучены водные извлечений из березовых почек (таблица 1).

Экстрагирование березовых почек проводилось методом мацерации. В экспериментальных исследованиях осуществлялся подбор оптимальных параметров проведения процесса экстрагирования, таких как время экстракции, температурные условия, вид экстрагента, влияние физических воздействий на извлечение, в частности обработка ультразвуком.

Оценку качества извлечений проводили количественно по выходу экстрактивных веществ и качественно по содержанию витамина С, присутствие которого косвенно свидетельствует об антиоксидантной активности извлечений.

При водной экстракции березовых почек наилучшие результаты наблюдались при режиме с длительностью 3 ч и температурой 50 °С, поскольку достигается высокий выход экстрактивных веществ и высокое содержание витамина С. Анализ табличных данных показывает также, что если при комнатной температуре настаивать березовые почки сутки, то выход экстрактивных веществ достигает примерно того же уровня, однако уровень витамина С в таких извлечениях вдвое ниже. Первый режим (опыт № 1, таблица 1) позволяет за более короткое время получить извлечение с достаточно высокими характеристиками.

Таблица 1.

Физико-химические свойства водных извлечений из березовых почек в соотношении 1:10

Параметры проведения экстракции				Физико-химические характеристики извлечений из березовых почек	
№ опыта	Температура, °С	Обработка экстракта ультразвуком	Время экстракции, ч	Сухой остаток, г	Содержание витамина С, мл/г
1	20	–	3	0,02±0,004	0,8155±0,0020
2	50	–	3	0,14±0,003	0,7979±0,0015
3	20	–	24	0,13±0,002	0,4019±0,0010

Примечание: «–» – отсутствие обработки ультразвуком.

Обработка ультразвуком осуществлялась на одном из трех этапов процесса экстракции: до начала процесса экстрагирования (способ 1), в середине процесса экстракции (способ 2) и по завершении (способ 3) (таблица 2). Как видно из таблицы 2, выход экстрактивных веществ во всех случаях значительно увеличивается по сравнению с контролем.

Максимальный эффект выхода экстрактивных веществ достигается в случае обработки ультразвуком сырья с экстрагентом перед процессом экстракции. Их содержание увеличивается примерно в 32 раза.

В водных экстрактах под воздействием ультразвука витамин С полностью идентифицировать не удалось, что, очевидно, связано с его нестойкостью к различного рода физическим воздействиям.

Для последующей экстракции в качестве нового перспективного экстрагента для извлечения биологически активных веществ из березовых почек была выбрана смесь изопропанол-вода.

Изопропиловый спирт является хорошим растворителем для многих органических соединений, как хорошо водорастворимых, так и трудно водорастворимых. Для жирорастворимых веществ (воски, эфиры) растворимость в изопропиловом спирте выше, чем в этиловом спирте и воде. Эти свойства экстрагента, предположительно, позволят извлечь более широкий спектр экстрактивных веществ. При этом изопропанол не образует вредные соединения с экстрагируемыми веществами, не вызывает коррозию оборудования,

имеет относительно низкую температуру кипения, его пары не вызывают токсического действия в отличие от метилового и этилового спиртов. Экономически его использование более выгодно в связи с низкой стоимостью.

В таблице 3 приведены данные по подбору оптимального соотношения изопропилового спирта с водой.

Надо отметить общую тенденцию: вне зависимости от доли изопропанола в экстрагенте максимальный выход экстрактивных веществ наблюдается при обработке сырья совместно с экстрагентом ультразвуком и дальнейшем экстрагировании при комнатной температуре в течение 3 ч. Данный способ достаточно прост в исполнении, экономичен, не требует высоких затрат энергии.

Таблица 2.

Физико-химические свойства водных извлечений из березовых почек, обработанных ультразвуком на разных стадиях экстрагирования

Параметры проведения экстракции				Физико-химические характеристики извлечений из березовых почек	
№ опыта	Температура, °С	Обработка экстракта ультразвуком	Время экстракции, ч	Сухой остаток, г	Содержание витамина С, мл/г
0*	20	–**	3	0,02±0,004	0,8155±0,0020
1	20	Способ 1	3	0,65±0,004	0,0000
2	20	Способ 2	3	0,44±0,005	0,0000
3	20	Способ 3	3	0,37±0,001	0,0000

Примечание: * – контроль, ** «–» – отсутствие обработки ультразвуком.

Обработка ультразвуком позволяет увеличить выход экстрактивных веществ в среднем в 2–4 раза.

Витамин С лучше всего экстрагируется из березовых почек при комнатной температуре в течение трех часов без обработки ультразвуком. Увеличение длительности экстракции (с 3 до 24 ч) или же повышение температурного режима (с 20 до 50 °С) приводит к снижению выхода витамина С из сырья в извлечении.

Содержание витамина С в изопропаноловых извлечениях из березовых почек выше, чем в водных, в 5–8 раз. Установлено, что при обработке изопропаноловых извлечений ультразвуком происходит снижение содержания аскорбиновой кислоты в 1,5–6 раз в зависимости от концентрации экстрагента.

Таблица 3.

Физико-химические свойства извлечений из березовых почек

Параметры проведения экстракции				Физико-химические характеристики извлечений из березовых почек	
№ опыта	Температура, °С	Обработка экстракта ультразвуком	Время экстракции, ч	Сухой остаток, г	Содержание витамина С, мл/г
экстракция смесью вода : изопропанол в соотношении 80:20					
1	20	–*	3	0,16±0,004	6,1173±0,0020
2	50	–	3	0,14±0,002	1,2232±0,0031
3	20	–	24	0,25±0,002	2,3584±0,0028
4	20	Способ 1	3	0,68±0,005	0,8213±0,0025
экстракция смесью вода : изопропанол в соотношении 70:30					
5	20	–	3	0,43±0,004	3,5640±0,0044
6	50	–	3	0,20±0,002	2,0387±0,0031
7	20	–	24	0,26±0,003	1,4197±0,0017
8	20	Способ 1	3	0,81±0,001	1,6309±0,0034
экстракция смесью вода : изопропанол в соотношении 60:40					
9	20	–	3	0,31±0,005	4,2911±0,0026
10	50	–	3	0,46±0,003	3,4842±0,0022
11	20	–	24	0,27±0,004	3,0089±0,0015
12	20	Способ 1	3	0,99±0,005	2,7742±0,0033

Примечание: *«–» – отсутствие обработки ультразвуком.

Из всех полученных и исследованных извлечений из березовых почек наиболее эффективным является способ получения экстракта березовых почек с помощью смеси вода – изопропанол в соотношении 60:40 при комнатной температуре в течение 3 ч с предварительной обработкой ультразвуком.

В данном случае удается получить максимальный выход экстрактивных веществ (что в 1,5 раза выше показателей водного извлечения, полученного в тех же условиях) и достаточно высокое содержание витамина С.

По органолептическим показателям извлечения из березовых почек представляют собой прозрачные жидкости светло-коричневого цвета с характерным спиртово-травяным ароматом, обусловленным наличием эфирных масел, слегка сладковатые на вкус.

Изопропаноловые извлечения из березовых почек сохраняют свою стабильность не менее 6 месяцев, в то время как срок хранения водных экстрактов составляет в среднем 3–5 дней. Рекомендуется хранить извлечения в стеклянных, хорошо закупоренных сосудах (пузырьках) при температуре 2–4 °С.

Эти извлечения после более детального изучения можно рекомендовать как биологически активную композицию для создания на его основе космецевтических средств (таких как лосьоны, гели и т.п.).

Надо отметить, что в дальнейшем предполагается более детальное изучение экстрактов с применением специфических точных идентификационных современных методов исследования с целью установления качественного и количественного состава экстрактивных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена экстракция березовых почек двумя видами экстрагента – водой и изопропиловым спиртом в различных концентрациях.

Анализ полученных извлечений позволил установить эффективность использования изопропилового спирта при экстракции березовых почек.

Обработка ультразвуком перед экстрагированием позволяет существенно (в разы) интенсифицировать процесс экстракции.

Наиболее перспективным для использования на данном этапе исследования нами признано извлечение из березовых почек, получаемый с помощью смеси вода – изопропанол в соотношении 60:40 при комнатной температуре в течение трех часов с предварительной обработкой ультразвуком. Данное извлечение характеризуется максимальным выходом экстрактивных веществ и содержит витамин С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.Л. Маттисон, О.П. Низковская, Е.А. Мартынова. Лечебное действие водных извлечений из березовых листьев // Растительные. ресурсы. 1965. Т. 1. Вып. 3. С. 377–380.
2. Береза в медицине: применение, свойства, рецепты, противопоказания. URL: http://tiensmed.ru/news/berezamed-i2l.html. (дата обращения 15.01.2016).
3. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд., доп. – М. 1987. 389 с.
4. Д.Н. Ведерников, В.И. Рощин. Экстрактивные вещества почек березы повислой Betula pendula Roth. (Betulaceae). 1. Состав жирных кислот, углеводородов и сложных эфиров // Химия растительного сырья. 2009. № 3. С. 69–73.
5. Д.Н. Ведерников, Н.Г. Галашкина, В.И. Рощин. Сложные эфиры почек Betula pendula (Betulaceae) // Растительные ресурсы. 2007. Вып. 3. С. 84–92.
6. Н.Г. Галашкина, Д.Н. Ведерников, В.И. Рощин. Флавоноиды почек Betula Pendula Roth. // Растительные ресурсы. 2004. Вып. 1. С. 62–68.
7. Д.Н. Ведерников, Н.Г. Галашкина, Н.Г. Карачкина, В.И. Рощин. Групповой состав компонентов почек Betula pendula Roth. // Растительные ресурсы. 2004. Вып. 2. С. 83–89.
8. Т.С. Кондратьева. Руководство к лабораторным занятиям по аптечной технологии лекарственных форм. – М.: Медицина, 1986. 288 с.
9. ГОСТ 24556-89. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С. – М.: Издательство стандартов, 1989. 16 с.
10. Л.А. Козицына, Н.Б. Куплетская. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. Учеб. пособие для вузов. – М.: Высшая школа, 1971. 264с.
11. А. Блажей, Л. Шутый, Фенольные соединения растительного происхождения. – М.: Мир, 1968. 166 с.

УДК 620.3:61

1 – Институт биохимической технологии и нанотехнологии «Российского университета 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: stanyar@yandex.ru
Тел.: 8 (499) 936 86 25

НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА: ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЯХ

И.Е. Станишевская[1], А.М. Стойнова[1], А.И. Марахова[1], Я.М. Станишевский[1]*

Резюме. В настоящее время нанотехнологии оказывают существенное воздействие на развитие медицины. Наночастицы серебра – один из наиболее изученных объектов нанотехнологии. В статье рассмотрены наиболее распространенные способы получения наночастиц серебра, их использование в новых разработках для применения в медицинских целях.

Ключевые слова: наночастицы серебра, нанотехнологии в медицине, антибактериальное, антисептическое действие.

SILVER NANOPARTICLES: PREPARATION AND USE FOR MEDICAL PURPOSES

I.E. Stanishevskaya[1], A.M. Stoinova[1], A.I. Marakhova[1], Ya.M. Stanishevskiy[1]*

Abstract. Currently nanotechnologies have a significant impact on the development of medicine. Silver nanoparticles is one of the most widely studied objects nanotechnology. The methods of preparation of silver nanoparticles. Examples of the use of silver nanoparticles in medicine and pharmacy.

Keywords: silver nanoparticles, nanotechnology in medicine, antibacterial, antiseptic, medical effects.

ВВЕДЕНИЕ

Устройства и структуры нанометровых размеров известны давно, еще греческий философ Демокрит для описания самой малой частицы вещества впервые использовал термин «атом». В 1959 г. американский физик Р.Ф. Фейнман впервые озвучил возможность создания веществ новым способом – «атомной укладкой», сам термин «нанотехнология» (nanotechnology) был впервые предложен в 1974 г. профессором Токийского университета Н. Танигучи (Norio Taniguchi) для обозначения процессов управления свойствами материалов на нанометровом уровне [1–3].

В настоящее время разработано большое количество методов получения наночастиц, позволяющих весьма точно регулировать размеры частиц, их форму и строение. На начальном этапе развития нанотехнологии особое внимание уделялось методам получения наночастиц серебра, и, в частности, широкое распространение и применение получило коллоидное наносеребро. Фармакологические свойства коллоидного серебра известны со второй половины XIX века, когда немецкий ученый Б. Креде совместно с химиками предложил препараты, содержащие серебро в неионизированном состоянии – в виде коллоидных частиц металлического серебра (препарат колларгол) и золя окиси серебра (препарат протаргол) [4]. Современные препараты серебра имеют широкий антибактериальный и антимикотический спектр действия, а наночастицы коллоидного серебра обладают более выраженным бактерицидным действием.

В статье рассмотрены наиболее распространенные способы получения наночастиц серебра, их использование в новых разработках для применения в медицинских целях.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

По принципу воздействия методы получения наночастиц можно разделить на две большие группы: диспергационные методы, или методы получения наночастиц путем измельчения обычного макрообразца (конденсация при сверхнизких температурах, варианты химического, фотохимического и радиационного восстановления, лазерное испарение), и конденсационные методы, или методы получения наночастиц из отдельных атомов (варианты механохимического дробления, конденсация из газовой фазы, плазмохимические методы и др.) [5].

К первой группе методов относится получение наночастиц серебра методом химического восстановления в растворах, при котором наночастицы серебра в водных растворах получают путем восстановления ионов серебра с помощью глюкозы, аскорбиновой кислоты, гидразина, боргидрида натрия и других восстановителей. Реакцию восстановления проводят в различ-

ных условиях. Например, в [6] восстановление глюкозой проводили при нагревании до 60 °С, а в качестве катализатора используют гидроксид натрия, в результате были получены частицы размером 10–20 нм, λ=1,5418 А°.

При радиационном облучении в растворе могут образовываться не только электроны, но и радикалы. С целью инактивации радикалов используют гасители радикалов, например спирты. Применение радиационного восстановления описано в работе [7]. Для получения коллоидного раствора наночастиц серебра авторами предложен способ, включающий растворение в воде нитрата серебра и полимера-стабилизатора – карбоксиметилхитина, барботирование инертного газа через слой раствора и гамма-облучение раствора дозой 2–12 кГр с восстановлением ионов серебра в наночастицы серебра. Процесс формирования наночастиц серебра состоит в генерировании сольватированных электронов в растворителе (воде) при действии гамма-облучения и последующем их взаимодействии с ионами серебра в растворе. Присутствие в подобных системах полимера-стабилизатора предотвращает нежелательную агломерацию и увеличение размера образующихся наночастиц серебра. В работе [8] авторами предложен упрощенный способ получения наночастиц серебра, включающий предварительное смешение 4% раствора нитрата серебра в этиловом спирте с 1% раствором гидроксида натрия в этиловом спирте с образованием оксида серебра, получение аммиачного раствора оксида серебра в этиловом спирте путем пропускания газообразного аммиака до полного растворения осадка, восстановление серебра из аммиачного раствора оксида серебра в этиловом спирте под воздействием акустической кавитации в течение 5–15 мин в присутствии этиленгликоля, диэтиленгликоля или глицерина, взятых в качестве органического растворителя. В 2015 г. запатентован способ получения наночастиц серебра без применения реагента-восстановителя, а методом экспонирования сереброборатного стекла при естественном солнечном свете или при рентгеновском облучении с образованием поверхностной пленки из наночастиц серебра и обеспечением высокого выхода продукта [9]. В работе [10] предложен способ получения наночастиц серебра в водной среде, включающий растворение стабилизаторов в дистиллированной воде, помещение в полученный раствор анода, выполненного в виде серебряной пластины, и катода – пластины из нержавеющей стали, электрохимическое растворение анода при пропускании через раствор стабилизированного постоянного тока.

К конденсационным методам относится способ получения изолированных наночастиц и нанопорошков методом осаждения из коллоидных растворов, который заключается в прерывании химической реакции между компонентами раствора, например, скачкообразным увеличением pH раствора в определенный момент времени, после чего система переходит из жидкого коллоидного состояния в дисперсное твердое состояние [11]. При получении антимикробных полимерных водорастворимых пленочных покрытий с наноразмерными структурами из серебра наночастицы серебра требуемого размера получают смешиванием водных растворов нитрата серебра и L-цистеина в мольном соотношении 1,25–2,00. Совмещение наночастиц серебра с поливиниловым спиртом проводится в 10–12% по массе водном растворе поливинилового спирта при температуре 85–90 °С и объемном соотношении смешиваемых растворов 1:1 с получением супрамолекулярного полимера [12, 13]. В 2016 г. выдан патент РФ на изобретение «Способ получения нанокристаллического порошка сульфида серебра» [14]. Авторами предложен на основе конденсационного метода простой способ получения однофазных беспримесных нанокристаллических порошков сульфида серебра с узким распределением частиц по размеру в заранее указанном диапазоне от 20 до 500 нм. Проводят осаждение из водного раствора смеси нитрата серебра и сульфида натрия в присутствии цитрата натрия при температуре 20–35 °С в течение 5–60 мин, в водном растворе исходные компоненты взяты в соотношении нитрат серебра : сульфид натрия : цитрат натрия = 1:(0.5÷10):(0.1÷2).

В последние годы возрос интерес к биосинтезу наночастиц серебра. В ГосНИИгенетика получают наночастицы сульфида серебра микроскопическими грибами [15]. При биосинтезе наночастиц бактериями используют штаммы рода *Rhodococcus, Pseudomona, Fusarium*; отмечено, что бактерии действуют как химический восстановитель, собирая из ионов серебра сферические наночастицы и продолжая размножаться [16, 17]. В патенте на изобретение [18] предложен способ получения композиции, содержащей коллоидное наносеребро. Он включает инкубирование пробиотических бактерий, выбранных из видов *Lactobacillus fermentum*, с водным раствором, содержащим не менее 4 мМ нитрата серебра. Композицию, содержащую коллоидное наносеребро, получают контактированием указанных бактерий при 5–45 °С с водным раствором, содержащим смесь нитрата серебра, аммиака и/или соль аммония, а также гидроксид щелочного металла.

Один из новых способов получения наночастиц металлов заключается в высокотемпературном наноимпринтинге на металлическую фольгу, в результате которого образуется отпечаток, содержащий наночастицы металлов с минимальной толщиной слоя 350 нм [19].

Наночастицы серебра вне зависимости от способа получения исследуют современными методами:

методом рентгеновской дифракции (XRD), методом трансмиссионной электронной микроскопии (TEM), просвечивающей электронной микроскопией, методом энергодисперсионного анализа, спектрофотометрическими методами [6, 7, 13, 20, 21].

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦЕВТИКЕ

Наночастицы серебра находят широкое применение в медицине для лечения и диагностики различных заболеваний: например, для лечения дерматитов инфекционного происхождения разработана мазь на основе наносеребра, для лечения анемий – капсулы наножелеза, нанодисперсный кремнезем (силикс) – для лечения отравлений, липофламин – для лечения инфаркта миокарда. Наносеребро используется для ингибирования вирусов ВИЧ и герпеса, как антимикробный и антибактериальный компонент в композициях, в иммунохимических методах исследования и для изучения биологических эффектов [22–26]. Коллоидное наносеребро входит в состав лечебно-косметических средств для защиты кожи от солнечных ожогов [27].

В настоящее время квантовые точки сульфидов, в том числе сульфида серебра, начинают применять в качестве флуоресцентных меток в биологии и медицине. Возбужденный сигнал многократно превосходит по яркости используемые в настоящее время органические красители. Это делает сульфиды перспективными материалами для распознавания биологических объектов и применения в медицинской диагностике и биотехнологии [14].

Коллоидный раствор наночастиц нульвалентного металлического серебра входит в состав гелеобразного наноструктурированного композитного имплантата для рыхлого заполнения зоны дефекта дистракционного регенерата трубчатых костей [28]. Также в хирургии, в частности для лечения ран, ожогов, повреждений, в качестве минимально травматичных, биосовместимых и биорастворимых антимикробных повязок для поврежденной кожи могут быть использованы пленки с наноструктурированным серебром, антибактериальные повязки, в состав которых в качестве диспергирующих агентов входят полиэтиленгликоль, глицерин и наночастицы серебра [12]. Пленочный материал, включающий коллоидный раствор наночастиц серебра [7], характеризуется высокой бактерицидной активностью, особенно по отношению к штаммам *Salmonella typhimurium* и *Staphilococcus aureus,* позволяет поддерживать поступление в область раны кислорода, необходимого для заживления, ускорить процессы регенерации и эпитализации, исключить травмирующую процедуру снятия пленки за счет биодеградации материала вплоть до полного его разложения на заживляемой поверхности. Исследователи предлагают ряд раневых покрытий на основе тканых и нетканых материалов природного или синтетического происхождения, содержащие наночастицы серебра [29, 30].

Разработаны также антиинфекционные пластыри с наносеребром для использования при лечении грыжи. Экспериментальные исследования показали, что при применении таких пластырей отпадает необходимость принимать большое количество антибиотиков для борьбы с инфекцией при лечении грыжи [31].

В последнее время всё более широкое распространение наночастицы серебра получают в области онкологии. Например, состав лекарственного средства для лечения рака легких включает следующие компоненты: порошок сферических наночастиц серебра диаметром 1–5 нм, фармацевтический диспергатор карбопол, триэтаноламин, глюкозу, чистую воду в качестве разбавителя. Результаты экспериментов показывают, что состав противораковых препаратов из наносеребра может полностью ингибировать пролиферацию клетки A549 человеческого немелкоклеточного рака легких и привести к смерти всех клеток [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время нанотехнологии оказывают существенное воздействие на развитие медицины: создаются новые ферменты, антитела, плазмиды, всё шире используются модификации биологических молекул и наночастиц металлов для создания на их основе новых материалов и устройств с целью ранней диагностики, прогностики и лечения социально значимых заболеваний человека.

Наночастицы серебра, широко используемые для получения различных материалов с антисептическими свойствами, – один из наиболее изученных объектов нанотехнологии, но диапазон их применения еще не до конца изучен. Необходимо продолжать исследования влияния наночастиц серебра на живые организмы и создавать новые, усовершенствованные методы их получения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. Кобаяси. Введение в нанотехнологию. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2008. 134 с.
2. М. Рыбалкина. Нанотехнологии для всех. Большое в малом. – М.: Nanotechnology News Network, 2005. 444 с.
3. В.Ю. Тимошенко. Фундаментальные основы нанотехнологий. URL: http://www.nano.msu.ru/education/courses/basics/materials (дата обращения 18.01.2016).
4. Z. Wanzhong. Synthesis of silver nanoparticles – Effects of concerned parameters in water/oil microemulsion // State Key Laboratory of Material

Processing and Die & Mould Technology. 2007. P. 17–21.

5. С.М. Комаров. Камера – обскура для нанотехнолога // Химия и жизнь. 2007. № 3. С. 32–36.
6. Л.Н. Кузьмина. Получение наночастиц серебра методом химического восстановления // Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева. 2007. Т. XXX, № 8. С. 7–12.
7. Патент РФ № 2474471. Коллоидный раствор наночастиц серебра, металл-полимерный нанокомпозитный пленочный материал, способы их получения, бактерицидный состав на основе коллоидного раствора и бактерицидная пленка из металл-полимерного материала / В.А. Александрова, Л.Н. Широкова. – Опубл. 10.02.2013; бюлл. № 4.
8. Патент РФ № 2448810. Способы получения наночастиц серебра / Р.Н. Галихметов, А.Г. Мустафин. – Опубл. 27.04.2012.
9. Патент РФ № 2547982. Способ получения наночастиц / Г.А. Сычева. – Опубл. 10.04.2015.
10. Патент РФ № 2390344. Способ получения наночастиц серебра в водной среде / Г.Н. Крейцберг и др. – Опубл. 27.05.2010. Бюл. 15
11. А.И. Гусев. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии. – М.: Физматлит, 2007. 416 с.
12. Патент РФ № 2542280. Способ получения пленок с наноструктурным серебром / О.А. Баранова, П.М. Пахомов. – Опубл. 20.02.2015. Бюлл. 5.
13. Патент РФ № 2562390. Способ получения наночастиц серебра / О.А.Баранова, П.М. Пахомов, С.Д. Хижняк. – Опубл. 20.08.2014. Бюлл. № 23.
14. Патент РФ № 2572421. Способ получения нанокристаллического порошка сульфида серебра / С.И. Садовников, А.А. Ремпель. – Опубл. 10.01.2016. Бюлл. № 1.
15. Т. Воейкова, И. Крестьянова, Л. Сахибгараева и др. Биосинтез наночастиц сульфида серебра микроскопическими грибами // Актуальная биотехнология. 2015. № 3(14). С. 51–51.
16. P. Mulvaney, Th. Linnert, A. Henglein. Surface Chemistry of Coiioidai Silver in Aqueous Solution: Observations on Chemisorption and Reactivity // The Journal of Physical Chemistry. 1991. V. 95. № 20. P. 36–36.
17. Ю.А.Крутиков, А.А. Кудринский, А.Ю.Олейник, Г.В.Лисичкин. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // Успехи химии. 2008. Т. 77. № 3. С. 242–269.
18. Патент РФ № 2460797. Способ получения композиции, содержащей коллоидные наносеребро или нанозолото / В. де Виндт, Т. Веркаутерен, В. Вестрате. – Опубл. 10.09.2012. Бюлл. № 25.
19. H. Mekaru. Formation of metal nanostructures by high-temperature imprinting // Microsystem Technologies. 2014. P. 1103–1109.
20. В.Ю. Жилкина Nanophox как инновационный прибор для работы по анализу лекарственных субстанций с наночастицами // Сборник трудов VIII Всероссийской школы-семинара студентов, аспирантов и молодых ученых по направлению «Диагностика наноматериалов и наноструктур». Рязань. 2015. Т. 3. С. 259–262.
21. А.И. Марахова, Я.М. Станишевский и др. Фармация будущего: нанолекарства и методы их анализа // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 1(10). С. 72–78.
22. М.Г. Григорьев, Л.Н. Бабич. Использование наночастиц серебра против социально значимых заболеваний // Молодой ученый. 2015. № 9. С. 396–401.
23. Л.С. Сосенкова, Е.М. Егорова. Наночастицы серебра малого размера для исследований биологических эффектов // Журнал физической химии. 2011. Т. 85. № 2. С. 1–10.
24. М.В. Самсонова. Наномедицина: современные подходы к диагностике и лечению заболеваний, вопросы безопасности // Пульмонология. 2008. № 5. С. 5–13.
25. F.A. Mohammed, L. Chen, P. Kalaichelvan. Inactivation of microbial infectiousness by silver nanoparticles-coated condom: a new approach to inhibit HIV- and HSV-transmitted infection // Int. J. Nanomedicine. 2012. № 7. P. 5007–5018.
26. Patent CN № 104415090. Prodution method of nano-silver antibacterial agent / S. Qixiang. – Publ. 18.03.2015.
27. Патент РФ № 2460797. Лечебно-косметическое средство для защиты кожи от солнечных ожогов / В.А. Теплов. – Опубл. 20.02.2013. Бюлл. № 5.
28. Патент РФ № 2495638. Способ стимуляции дистракционного замедленно созревающего регенерата трубчатых костей / С.П. Миронов, Г.А. Кесян и др. – Опубл. 20.10.2013. Бюлл. № 29.
29. Патент РФ № 2314834. Раневое покрытие / С.В. Дробыш, А.А. Волков. – Опубл. 20.01.2008. Бюлл. № 2.
30. Patent CN № 103785857. Nano-silver used for antimicrobial dressing and preparation method thereof / L. Wei, X. Chanchan. – Publ. 14.05.2014.
31. Patent CN № 103893830. Nano-silver anti-infection hernia repair patch and preparation method thereof / L. Wenbo. – Publ. 02.07.2014.
32. Patent CN № 103933067. Nano-silver anti-cancer composition for treating lung cancer as well as preparation method and application thereof / L. Jinjun, S. Weiyi, L. Qiangbay. – Publ. 23.07.2014.

УДК 615.371, 577.11

1 – ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт (РосНИПЧИ) «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46

1 – Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: rusrapi@microbe.ru

КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ: СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ СОЗДАНИИ ТРАНСДЕРМАЛЬНЫХ ФОРМ ВАКЦИН

М.Н. Киреев[1]*, О.А. Волох[1], А.К. Никифоров[1]

Резюме. В статье представлены результаты модельных экспериментов по конструированию прототипа трансдермального варианта чумной химической вакцины. Целью данной работы было показать принципиальную возможность создания композита на основе природных биополимеров и возможность использования его как депо антигенов химических вакцин на примере капсульного антигена чумного микроба.

Ключевые слова: природные биополимеры, капсульный антиген чумного микроба, вакцины.

NATURAL BIOPOLYMER-BASED COMPOSITES: PROPERTIES AND PROSPECTS OF UTILIZATION IN CONSTRUCTING TRANSDERMAL FORMULATION OF VACCINES

M.N. Kireev[1]*, O.A. Volokh[1], A.K. Nikiforov[1]

Abstract. Represented are the results of model experiments in the construction of chemical plague-vaccine transdermal variant prototype. Objective of the study is to demonstrate the possibility in principle to design natural biopolymer-based composite and feasibility of its application as depot antigens of chemical vaccines by the example of plague microbe capsular antigen.

Keywords: natural biopolymers, plague microbe capsular antigen, vaccines.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все большее внимание уделяют альтернативным способам введения в организм пациента лечебных и профилактических препаратов, в том числе вакцин. Для ряда инфекций перспективным является применение трансдермального способа введения. При конструировании таких систем наиболее подходящими материалами, на наш взгляд, являются композиции из природных полимеров животного и растительного происхождения – хитозана и альгината натрия [1–3, 5, 6]. Они обладают рядом свойств, которые будут полезны для биотехнологов.

Ранее мы говорили о применении материалов из природных полисахаридных биополимеров в качестве контейнеров или матрикс-депо для компонентов химических вакцин – антигенов. В настоящее время накопилось достаточное количество фактических экспериментальных данных, позволяющих использовать полисахариды природного происхождения не только как контейнеры для антигенных компонентов медицинских иммунобиологических препаратов, но и как активные составляющие химических вакцин антигенного и клеточного уровня, позволяющие усилить иммунный ответ макроорганизма на введенные антигены и снизить возможные неблагоприятные последствия применения лекарственных препаратов [1–3, 5]. Особенно интересны перспективы применения биосовместимых и биодеградируемых природных полисахаридов при конструировании трансдермальных форм вакцинных и лекарственных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для конструирования прототипа вакцинного пластыря мы использовали различные варианты нетканого полотна, полученного из нановолокон хитозана путем электроформирования, а также композит, полученный из хитозана и альгината натрия. Мы использовали хитозан пищевой низкомолекулярный, произведенный в ЗАО «Биопрогресс», и готовую пластифицирующую смесь альгината и хитозана производства ЗАО «НПК «Космотерос». В качестве биологически активного компонента – капсульный антиген чумного микроба. Такой выбор не случаен: данный антиген хорошо изучен, это основной иммуноген возбудителя чумы, он является важнейшей составной частью большинства чумных профилактических и диагностических препаратов, и, что не менее важно, ранее мы показали, что он сохраняет свои биологические и иммунологические свойства в течение длительного периода даже при комнатной температуре [8, 9]. Такие харак-

теристики, на наш взгляд, позволяют говорить о возможности использования этого антигена для конструирования трансдермального варианта химической чумной вакцины.

Для модельного эксперимента антиген в сухом виде вносили в смесь полимеров и сополимеров, тщательно перемешивали, добавляли воду и полимеризовали в чашках Петри или раствором антигена пропитывали полоску нетканого полотна из хитозана. Получали композит, имеющий однородную структуру и пластичную консистенцию. Затем из полученного композита пробойником вырезали кусочки, равные по размеру и объему лунке агарового геля для реакции преципитации, ставили реакцию иммунодиффузии с противочумной сывороткой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При конструировании трансдермальных форм компоненты химической вакцины – антигены могут быть адсорбированы или заключены в матриксы из природных биодеградируемых полисахаридов и в таком виде нанесены на кожу пациента. В последнее время два природных полисахарида, хитозан и альгинат натрия, получили широкое применение в фармацевтической промышленности благодаря своим уникальным свойствам.

Они имеют много общего:

1) оба полимера имеют природное происхождение (хитозан – животное, а альгинат – растительное);

2) оба полимера биодеградируемы, т.е. распадаются в организме человека до своих составляющих (мономеров) и выводятся естественным путем;

3) оба полимера в определенных условиях образуют разные морфологические формы.

Главное отличие состоит в том, что хитозан имеет положительный суммарный заряд, а альгинат – отрицательный. Эти свойства дают возможность фармацевтам-технологам использовать их в различных вариациях при конструировании лекарственных препаратов.

Растворимость хитозана в водных кислых средах позволяет перерабатывать его и создавать различные морфологические формы (гели, пленки, нетканый материал, микрокапсулы). На рисунке 1 показан нетканый материал из хитозанового волокна и зондовая микроскопия самого волокна. Такая модификация способствует варьированию его структуры и получению материалов с заданными свойствами, позволяющими пролонгировать действие биологически активных компонентов, обладающих иммуномодулирующим эффектом, повышенной антимикробной активностью или высокой термостабильностью при сохранении биодеградации.

В результате было показано, что капсульный антиген чумного микроба, включенный в композит из природных биополимеров, сохраняет свои иммунохимические свойства, что антиген постепенно выходит

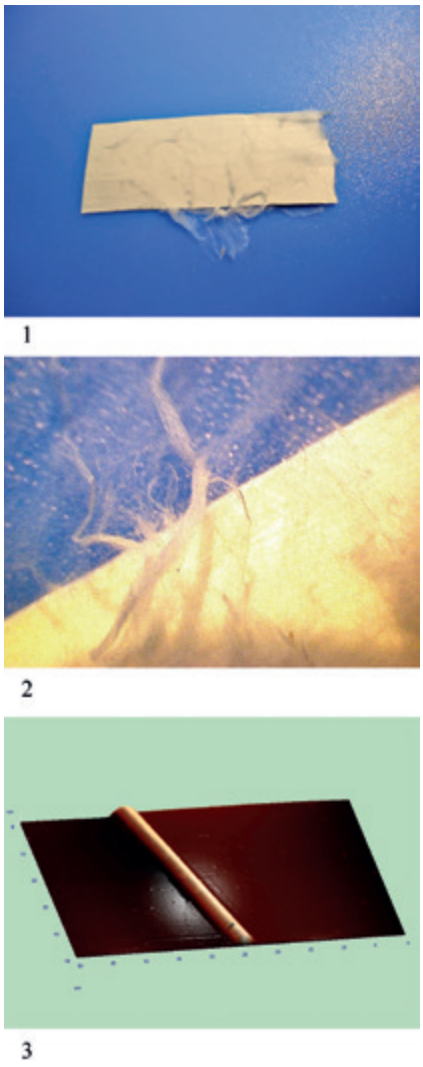


Рисунок 1. Нетканое полотно из волокон хитозана:
1 – вид в натуральную величину;
2 – вид при 100-кратном увеличении;
3 – волокно из хитозана (зондовая микроскопия)

из сконструированного композита и образует линию преципитации, соответствующую нативному, не включенному в подложку антигену. Это говорит о том, что связь капсульного антигена чумного микроба с компонентами композита из хитозана и альгината не ковалентная, а обусловлена адсорбционными взаимодействиями и скорость диффузии антигена выше, чем сила его сродства к композиту. Причем линии преципитата появлялись с некоторой задержкой относительно лунки со свободным антигеном (рисунок 2). При хранении полученного композита с антигеном в условиях, предотвращающих его высушивание, и при температуре 6 °С антиген сохранял свои иммунохимические свойства до 12 месяцев (срок наблюдения).

Ранее мы изучили иммуномоделирующее свойство хитозана на примере антигенов возбудителей двух опасных инфекций. Опыты ставили на беспородных белых мышах. В качестве антигенов использовали капсульный антиген чумного микроба и протективный

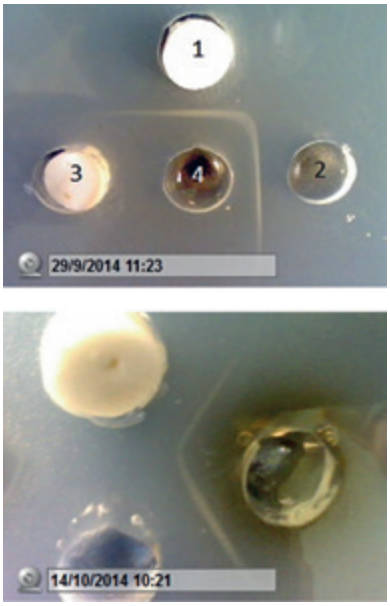


Рисунок 2. Реакция иммунодиффузии капсульного антигена чумного микроба и композита из хитозана и альгината натрия, содержащего этот антиген:

1 – композит с капсульным антигеном чумного микроба;

2 – чистый антиген;

3 – композит без антигена;

4 – антисыворотка против антигена

антигенный комплекс возбудителя туляремии. Было показано, что при одинаковой антигенной нагрузке титры специфических антител у животных, иммунизированных антигенами с хитозаном, были в 8–10 раз выше, чем у контрольной группы, иммунизированной только антигеном [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трансдермальные вакцинные препараты перспективны тем, что их применение не требует присутствия высококвалифицированного медицинского персонала, отсутствует иглобоязнь у пациента, имеется возможность создания персонифицированных вакцин, с подбором индивидуальной дозы активных веществ вакцины – антигенов.

Необходимо отметить, что в слои подложки с активными компонентами – антигенами можно добавлять лекарственные вещества, стимулирующие иммуногенез, повышающие прохождение антигенов через кожу и всасывание препаратов. При конструировании изделий медицинского назначения, основанных на принципах адсорбции антигенов, анатоксинов, ферментов с дальнейшим использованием биологической активности этих компонентов в макроорганизме (вакцины, лекарственные препараты), принципиально важно, что природные биополимеры при своей биоинертности практически не изменяют основные характеристики биологически активных веществ, но в то же время сами обладают бактерицидной активностью и адъювантным действием.

Таким образом, композиты из экологически чистых, биосовместимых и биодеградируемых природных полимерных материалов могут быть использованы при конструировании трансдермальных профилактических препаратов, оформленных в виде накожного пластыря.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю.З. Гендон, С.Г. Маркушин, Г.Г. Кривцов, И.И. Акопова. Хитозан как адъювант для инактивированных гриппозных вакцин, вводимых парентерально // Вопросы вирусологии. 2008. № 5. С. 14–19.
2. Ю.З. Гендон, Ю.М. Васильева, С.Г. Маркушин, И.И. Акопова, И.Б. Коптяева, Г.Г. Кривцов. Хитозан как адъювант для инактивированных вакцин против вирусов гриппа птиц // Журн. микробиол. 2009. № 2. С. 40–47.
3. Ю.М. Васильев. Адъюванты гриппозных вакцин – современное состояние // Журн. микробиол. 2010. № 1. С. 100–110.
4. Г.М. Стрелецкий, М.С. Краснов, Е.Ю. Рыбакова и др. Исследование влияния композиции на основе хитозанового геля и биорегулятора сыворотки крови на заживление гнойных ран у мышей // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. № 4. С. 211–214.
5. А.Б. Шиповская, В.И. Фомина, М.Н. Киреев, Е.С. Казакова, И.А. Касьян. Биологическая активность олигомеров хитозана // Известия Саратовского университета. Серия: Химия. Биология. Экология. 2008. Т. 8. Вып. 2. С. 46–49.
6. Избранные труды по комбустиологии / Под ред. Н.В. Островского. – Саратов: Научная книга, 2009. 275 с.
7. J.A. Mikszta, J.P. Dekker, N.G. Harvey et al. Microneedle-based intradermal delivery of the anthrax recombinant protective antigen vaccine // Infect. Immun. 2006. V. 74. № 12. P. 6806–6810.
8. М.Н. Киреев, Т.М. Тараненко, Т.А. Храмченкова и др. Структурно-функциональные свойства препаратов капсульного антигена Ф1 в процессе хранения // Биотехнология. 2005. № 5. С. 41–43.
9. М.Н. Киреев, Т.М. Тараненко, Т.А. Храмченкова и др. Изучение стабильности антигенных компонентов чумной химической вакцины (Ф1+ОСА) в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. № 1(99). С. 70–74.
10. М.Н. Киреев, О.А. Волох, А.К. Никифоров. Современные биотехнологические подходы для создания профилактических препаратов // Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: материалы международной конференциии. – М. 2015. С. 193–195.

BIO TECH WORLD

15-17 МАРТА 2016

МОСКВА, НОВЫЙ АРБАТ, 36
(Здание Правительства Москвы)



При поддержке Правительства Москвы

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

«БИОТЕХНОЛОГИИ В КОМПЛЕКСНОМ РАЗВИТИИ РЕГИОНОВ»

XIV МЕЖДУНАРОДНАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫСТАВКА

«МИР БИОТЕХНОЛОГИЙ–2016»

www.mosbiotechworld.ru

ОРГАНИЗАТОРЫ

Министерство промышленности и торговли Российской Федерации

Министерство образования и науки Российской Федерации

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Министерство экономического развития Российской Федерации

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)

Российская академия наук

Департамент науки, промышленной политики и предпринимательства г. Москвы

Департамент природопользования и охраны окружающей среды г. Москвы

Российский союз химиков

ООО «Экспо-биохим-технологии»

BIO ТЕХНОЛОГИИ

ООО «Экспо-биохим-технологии»
+7 (495) 645 78 70, 780 41 09
E-mail: ser@biomos.ru
www.mosbiotechworld.ru

ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ КОНФЕРЕНЦИИ

СЕКЦИИ:

- Биоэнергетика
- Генно-инженерные технологии в сельскохозяйственном производстве
- Пищевая биотехнология
- Биотехнология в решении проблем охраны окружающей среды
- Промышленная экология. Внедрение и развитие биотехнологий по направлениям ТП «Технологии экологического развития»
- Охрана здоровья населения. Качество жизни и активное долголетие
- Инновации, финансы и бизнес в становлении биотехнологической индустрии в регионах
- Биотехнология и образование
- Биотехнологические проекты – стимул развития региональной инфраструктуры

КРУГЛЫЕ СТОЛЫ:

- Биотехнология для решения актуальных проблем АПК в странах СНГ и ЕврАзЭС
- Лесная биотехнология
- Биоматериалы в здравоохранении и биоиндустрии
- Ключевые биотехнологии робототехнических комплексов
- Биоэтика и Российское законодательство о биологической и медицинской этике

ПРЕЗЕНТАЦИИ РЕГИОНОВ И ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ, СЕМИНАРЫ

ТЕМЫ ВЫСТАВКИ «МИР БИОТЕХНОЛОГИЙ 2016»

- Процессы и аппараты для биотехнологических производств и лабораторных исследований. Компьютерные технологии.
- Лабораторно-аналитическое оборудование и биоаналитические комплексы.
- Биочипы и биосенсоры.
- Весь спектр биопродуктов для фармацевтической и пищевой промышленностей, агропромышленного комплекса, биогеологии, промышленных производств, а также биоагенты для охраны и восстановления окружающей среды.
- Биологически-активные добавки.
- Тест-системы для определения алкоголя и наркотических веществ.
- Биокаталитические технологии.
- Питательные среды.
- Биопрепараты для медицины и косметологии, а также готовые продукты на их основе.
- Альтернативные источники энергии, в т.ч. из возобновляемого сырья.
- Промышленная и лабораторная безопасность.

КОНКУРС НА ЛУЧШУЮ ПРОДУКЦИЮ

представленную на выставке «Мир биотехнологий-2016»,
условия участия сайте: www.mosbiotechworld.ru

КОНКУРС МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ-БИОТЕХНОЛОГОВ

Прием тезисов докладов участников конференции до 10 января 2016. Правила оформления тезисов и условия участия в конкурсе на сайте: *www.mosbiotechworld.ru/rus/pub.phps/pub.php*

УДК 615.1, 615.3, 57.013

1 – Научно-производственная биотехнологическая платформа «ЭкспертБИОТЕХ», 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18

1 – R&D and Pilot Plant Biotechnological Platform «ExpertBIOTECH», 18, Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail:
dmitriy.gusarov@expert-biotech.com

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ГЛФ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Т.В. Будыльская[1], Д.В. Бырихина[1], А.И. Государев[1], В.Д. Гусарова[1], Ф.М. Ижаева[1], П.В. Михайлов[1], Д.А. Гусаров[1]*

Резюме. Биофармацевтические препараты, предназначенные для генной терапии, большей частью основаны на суперскрученных плазмидных ДНК, получаемых в клеточных линиях бактерий. Свойства, включая стабильность при хранении, готовых лекарственных форм на основе таких препаратов изучены крайне плохо. В данной статье нами была рассмотрена типичная фармацевтическая разработка готовых лекарственных форм в виде лиофилизата. С помощью валидированного комплекта аналитических методов производился контроль за стабильностью препарата, а также был подобран и оптимизирован состав готовой формы.

Ключевые слова: генная терапия, фармацевтическая разработка, суперскрученная плазмида, биотехнология.

PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF FORMULATION BASED ON BIOPHARMACEUTICAL PREPARATIONS FOR GENE THERAPY

T.V. Budylskaya[1], D.V. Byrikhina[1], A.I. Gosudarev[1], V.D. Gusarova[1], F.M. Izhaeva[1], P.V. Mikhailov[1], D.A. Gusarov[1]*

Abstract. Biopharmaceuticals intended for gene therapy are mostly presented by supercoiled plasmid DNA obtained with bacteria cell lines. The properties of their formulations, including stability under different storage conditions, are barely studied. This article describes the typical pharmaceutical development of freeze-dried gene therapeutics. By means of process analytical technological methods the preparations formulated were controlled during storage. Furthermore, the composition of the formulations was optimized for prolonged storage.

Keywords: gene therapy, pharmaceutical development, supercoiled plasmid, biotechnology.

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия – это методология коррекции различных дефектов путем введения в клетки организма недостающей или исправляющей генетической информации. На сегодняшний день наиболее безопасный способ подобного рода коррекции – использование плазмид, содержащих в своей структуре экспрессируемые целевые гены, в качестве средства внутригенетической доставки [1]. С этой целью плазмидная ДНК, закодированная в клеточных линиях прокариот, выделяется из продуцента, очищается до сверхвысоких степеней чистоты и формулируется для инъекционного введения. В России одним из наиболее известных препаратов для генной терапии является «Неоваскулген», применяемый для лечения ишемии нижних конечностей [2]. Кроме того, ряд плазмидных препаратов находится в стадии разработки и доклинических/клинических исследований (например, [3]).

Ранее мы описывали разработку технологии получения суперскрученной плазмидной ДНК [4]. Кратко: продуцент на основе *Escherichia coli* выращивался в биореакторе волнового типа, затем культуру убивали с одновременным кислотным лизисом, перфузионно отделяли маточный раствор от белкового лизат-прецепитата, целевой белок в составе маточного раствора последовательно очищали с помощью аффинной, ионообменной и гель-фильтрационной хроматографии с получением сверхчистого материала, который затем формулировали с помощью тангенциальной фильтрации и лиофилизировали. Получаемый в результате продукт – готовая лекарственная форма (ГЛФ) должна быть стабильна в течение длительного срока хранения, а вариант исполнения этой ГЛФ должен обеспечивать препарату стабильность и безопасность.

Цель настоящего исследования – провести фармацевтическую разработку состава ГЛФ на основе препарата из суперскрученной плазмиды, а именно оптимизировать процесс получения ГЛФ, разработать форму и компонентный состав.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходное сырье

Активная фармацевтическая субстанция (АФС), содержащая суперскрученную ДНК с концентрацией 1 мг/мл и декстрозы моногидрат в концентрации 60 мг/мл, растворенные в фосфатном буферном растворе (общая концентрация фосфатов натрия 10 мМ, из них натрия дигидрофосфата дигидрата 13%, натрия гидрофосфата додекогидрата 87%, pH 7,8).

Входной и выходной контроль:

Метод ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ИО-ВЭЖХ). При аналитическом контроле содержания (количество и процент чистоты) плазмиды в препарате использовали систему для жидкостной хроматографии Akta Purifier 10* (GE Healthcare, США), снабженную двумя двухплунжерными насосами высокого давления, детектором в УФ-области (длина волны 254 нм), полуавтоматическим аппаратом дозированного ввода образца (дозирующая петля 20 мкл), датчиками pH и проводимости, программным обеспечением Unicorn 5.1, использующимся для получения, оцифровки и анализа данных. Применяли аналитическую колонку 4,0×250 мм IonPac AS14 (Dionex, Thermo Scientific, Германия). Для указанной хроматографической колонки были подобраны следующие условия анализа: подвижная фаза, включающая сульфат аммония и хлорид натрия (суммарная концентрация 2,1М), ЭДТА – 1 мМ (для нивелирования влияния возможных двухвалентных металлов в воде на качество элюирования), трис – 100 мМ, pH 7,0; температура – комнатная; скорость потока – 120 см/ч.



Гибкая и интуитивно-понятная хроматографическая система ÄKTA pure (модель, заменяющая систему жидкостной хроматографии Akta Purifier 10)

Метод электрофореза в агарозном геле с окраской бромистым этидием (ЭФ). При аналитическом контроле содержания примесей в препарате использовали систему горизонтального электрофореза HE 33 Mini Submarine Unit (GE Healthcare, США), снабженную камерой для агарозного геля и источником напряжения; визуализацию осуществляли в УФ-свете под трансиллюминаторной лампой 260 нм. Электрофорез с бромистым этидием выполняли в соответствии с известной методикой [5] в 1% агарозном геле с использованием системы горизонтального электрофореза HE 33 Mini Submarine Unit (GE Healthcare, США), визуализацию осуществляли в УФ-свете под трансиллюминаторной лампой 260 нм.

Содержание влаги в лиофилизате анализировали методом Фишера [6].

Оборудование

Для автоматизированного дозированного наполнения использовали станцию дилютер-диспенсер Microlab 600 (Hamilton, Великобритания).

Для лиофилизации препарата использовалась лиофильная сушка FreeZone Triad (Labconco, США).

Все операции проводились в чистых комнатах категории «Д» под ламинарным потоком в шкафу Maxisafe 2020 (Thermo, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка формы ГЛФ

Суперскрученная плазмидная ДНК, составляющая основу ГЛФ, предназначена для непосредственного введения в организм больных, и поскольку суперскрученная плазмида трансфецирует живую культуру клеток человека, то требования к ГЛФ должны быть такими же, как в случае любого препарата инъекционного введения. Основными требованиями к инъекционным препаратам являются: стабильность (в том числе при хранении), стерильность, прозрачность (свобода от частиц), апирогенность, изотоничность; растворители, исходные и вспомогательные вещества, применяемые для приготовления лекарственных форм для инъекций, должны быть разрешенными к медицинскому применению и соответствовать требованиям нормативно-технической документации [7].

Такие требования, как стерильность, прозрачность, апирогенность, описываются фармакопейной статьей предприятия (проект), разработанной на основании ОСТ 91500.05.001.00 «Стандарты качест-

* Модель снята с производства.

ва лекарственных средств. Основные положения» (таблица 1).

Таблица 1.

Основные показатели, нормируемые проектом фармакопейной статьи на АФС

Показатель	Метод
Содержание действующего вещества (в мкг/мл)	GeneJET Plasmid Miniprep и спектрофотометрический
Описание	Визуальный
Растворимость	Визуальный
Подлинность	Спектрофотометрический – Отношение D260/280 – Максимум поглощения, нм – Минимум поглощения, нм
Прозрачность раствора	ГФ XII
Цветность раствора	ГФ XII
pH	Потенциометрический, ГФ XII
Механические включения	РД 42-501-98, визуальный метод
Посторонние примеси (родственные соединения), % (суммарно)	ИО-ВЭЖХ, электрофорез
Бактериальные эндотоксины, ЕЭ/мл	ГФ XII, ЛАЛ-тест
Стерильность	ГФ XII (метод прямого посева или мембранной фильтрации)
Количественное определение, г/л	ИО-ВЭЖХ

Все растворители, используемые для создания ГЛФ, основаны на воде для инъекций. Поэтому в рамках фармацевтической разработки ГЛФ нами изучался компонентный состав ГЛФ (стабилизаторы и консерванты), обеспечивающий как химическую, так и микробиологическую стабильность суперскрученной плазмидной ДНК в составе препарата, а также способ получения ГЛФ.

1.1. Стабилизаторы

Стабилизаторы – это вещества, повышающие химическую устойчивость лекарственных средств в растворах для инъекций. Стабилизаторы могут выполнять функции предотвращения гидролиза основного компонента, его окисления или иных видов химической деградации. В рамках исследования мы изучали различные, разрешенные Министерством здравоохранения Российской Федерации стабилизаторы, а также стабильность плазмиды в составе ГЛФ без использования каких-либо стабилизаторов. При этом все растворы плазмиды (с добавлением и без добавления стабилизаторов) стерилизовались фильтрацией через фильтры 0,2 мкм в специально подготовленные (мытые и стерилизованные термически) флаконы объемом 1 мл (объем заполнения 0,5 мл), которые хранились при комнатной температуре под ламинарным потоком в чистой зоне категории «А», закупоренные крышкой (ускоренное хранение в течение месяца при комнатной температуре соответствовало двухлетнему хранению при температуре ниже минус 5 °С [8]). Такой способ подготовки и хранения образцов был необходим во избежание попадания в раствор микроорганизмов и для исключения микробиологической нестабильности препарата из эксперимента. По истечении контрольного срока 1 месяц флаконы вскрывались, содержимое анализировали методом ИО-ВЭЖХ. В рамках эксперимента изучали снижение концентрации и процентного содержания (чистоты) плазмиды в растворах для оценки степени влияния стабилизаторов (таблица 2). Под степенью нестабильности мы понимали процент падения концентрации основного компонента в растворах. Под степенью деградации мы понимали процент снижения чистоты плазмиды в растворах.

Как видно из данных таблицы, при месячном хранении плазмида без введения стабилизатора имеет тенденцию к деградации. Причину деградации (окисление, гидролиз или потеря третичной суперскрученной структуры) определить не удалось. Среди изученных стабилизаторов, давно и успешно используемых в составе различных лекарственных форм, большая часть никак не способствовала стабилизации плазмиды. Некоторые вещества (натрия цитрат, натрия тиосульфат и ЭДТА), наоборот, способствовали разрушению плазмиды. Использование хлорида натрия в физиологической концентрации, как нам кажется, способствовало стабилизации плазмиды, хоть и не стопроцентно. Тем не менее это единственное соединение, при использовании которого плазмида не разрушилась до чистоты менее 95%, предельного значения по ФСП. Возможно, повышение концентрации NaCl могло бы способствовать улучшению стабильности препарата. Однако это повысило бы и осмолярность ГЛФ, изменив ее изотонические свойства и сделав непригодной для использования для живых клеток.

1.2. Консерванты

Консерванты – это вспомогательные вещества, применяемые для предотвращения контаминации и размножения микроорганизмов в лекарственных препаратах. Для изучения микробиологической стабильности образцы готовили так же, как в предыдущем опыте 1.1, за тем исключением, что разлитые в чистой зоне категории «А» и закупоренные флаконы не хранились в этой чистой зоне, а выносились наружу. Они хранились в некатегорируемом помещении на лабораторном столе при комнатной температуре. Для каждого консерванта (и без него) брали по четыре флакона с образцом. По истечении контрольного срока 1 месяц флаконы вскрывались, содержимое анализировали методом ИО-ВЭЖХ, а также прямым посевом содержи-

Таблица 2.

Использование основных, разрешенных на территории России стабилизаторов для химической стабилизации плазмиды в составе ГЛФ

Стабилизатор	Концентрация плазмиды, мг/мл		Степень нестабильности, %	Чистота ДНК, %		Степень деградации, %
	до хранения	после хранения		до хранения	после хранения	
Отсутствует	1,02	0,86	15,69	96,4	91,5	5,08
0,9% NaCl	1,02	0,98	3,92	96,4	95,4	1,04
50 мМ натрия цитрат	1,02	0,41	59,80	96,4	61,2	36,51
2 мМ ЭДТА	1,02	0,55	46,08	96,4	72,4	24,90
0,5 мМ метионин	1,02	0,87	14,71	96,4	90,4	6,22
2 мМ метионин	1,02	0,89	12,75	96,4	90,6	6,02
100 мМ аргинин	1,02	0,87	14,71	96,4	91,8	4,77
1 М аргинин	1,02	0,87	14,71	96,4	91,2	5,39
10 мМ цистеин	1,02	0,88	13,73	96,4	92	4,56
50 мМ цистеин	1,02	0,84	17,65	96,4	90,8	5,81
0,5 мМ тетацин	1,02	0,84	17,65	96,4	91	5,60
2 мМ тетацин	1,02	0,84	17,65	96,4	91,1	5,50
25 мМ натрия аскорбат	1,02	0,88	13,73	96,4	92,7	3,84
25 мМ натрия п-аминосалицилат	1,02	0,9	11,76	96,4	93,7	2,80
20 мМ натрия тиосульфат	1,02	0,31	69,61	96,4	66,6	30,91
50 мМ натрия нитрит	1,02	0,77	24,51	96,4	88,7	7,99
100 мМ натрия нитрит	1,02	0,77	24,51	96,4	88,9	7,78
1 мМ диоксид титана	1,02	0,84	17,65	96,4	90,9	5,71
20 мМ магния стеарат	1,02	0,88	13,73	96,4	91,7	4,88
10 мМ декстран	1,02	0,86	15,69	96,4	91,1	5,50
10 мМ целлюлоза	1,02	0,86	15,69	96,4	91,8	4,77
2 мМ диоксид титана	1,02	0,85	16,67	96,4	91	5,60
5 мМ диоксид титана	1,02	0,84	17,65	96,4	91,1	5,50
50 мМ магния стеарат	1,02	0,87	14,71	96,4	92,1	4,46
20 мМ E553b	1,02	0,86	15,69	96,4	91,6	4,98

мого каждого флакона на среде Сабуро. По ИО-ВЭЖХ определяли степень деградации. Пересев на питательной среде проводили для определения микробиологической контаминации [9]. Для каждого такого определения готовили взвеси тест-штаммов с конечной концентрацией 100 КОЕ/мл. ИО-ВЭЖХ-определения проводили сразу; микробиологические определения проводили через пять суток инкубирования опытных образцов при комнатной температуре. В том случае, если рост микроорганизмов на средах с образцами ГЛФ превышал их рост на контрольных растворах, такие флаконы определяли как нестерильные (таблица 3).

Как видно из представленной таблицы, некоторые общеиспользуемые в фармакологии консерванты являются губительными для структуры плазмиды. Так, все спирты и кислоты разрушают плазмиду, что очень хорошо подтверждается аналитическим контролем с помощью ИО-ВЭЖХ. Металлоорганические соединения и соли органических кислот и спиртов не так губительны и в целом обеспечивают стерильность. Однако без использования консерванта плазмида, разлитая описанным выше способом по модельным флаконом, также оказалась стерильной, что говорит о том, что раствор ГЛФ может быть использован вообще без консерванта.

Итак, консервант для микробиологической стабилизации не требуется. Химической стабилизации в некоторой степени удалось добиться при добавлении к раствору плазмиды хлорида натрия до концентрации 0,9%. Однако даже в этом случае при ускоренном хранении при комнатной температуре в течение месяца плазмида имеет тенденцию к частичной деградации (чистота плазмиды снизилась с 96,4 до 95,4%), поэтому полной химической стабилизации ГЛФ в жидкой форме добиться не удалось. В связи с этим было принято решение лиофилизировать раствор плазмиды без добавления стабилизаторов. Общеизвестно, что стабильность твердых (высушенных) препаратов выше, чем стабильность жидких. В следующем разделе описывается разработка способа лиофилизации ГЛФ плазмиды.

2. Разработка процесса получения ГЛФ

Приготовление ГЛФ (розлив и лиофильное высушивание) должно обеспечивать препарату стабильность и безопасность. То есть препарат в составе ГЛФ должен оставаться стерильным и не разрушаемым как во время операций по приготовлению ГЛФ, так и в ходе хранения.

Приготовление ГЛФ препарата состоит из следующих этапов:

– подготовка сырья, АФС (оттаивание замороженного раствора);

– стерильная фильтрация сырья;

Таблица 3.

Использование основных, разрешенных на территории России консервантов для микробиологической стабилизации плазмиды в составе ГЛФ

Консервант	Чистота ДНК (ИО ВЭЖХ), %		Степень деградации, %	Стерильность (прямой посев)*
	до хранения	после хранения		
Отсутствует	96,4	91,60	4,98	++++
5% этиловый спирт	96,4	45,40	52,90	++++
0,5% бензиловый спирт	96,4	46,10	52,18	++++
0,3% фенилэтиловый спирт	96,4	41,10	57,37	++++
0,25% фенол	96,4	28,10	70,85	++++
0,5% фенол	96,4	28,80	70,12	++++
0,1% хлоркрезол	96,4	28,10	70,85	++++
0,1% бензойная кислота	96,4	28,14	70,81	++++
0,2% бензойная кислота	96,4	29,10	69,81	++++
0,1% сорбиновая кислота	96,4	92,16	4,40	++++
0,01% бензалкония хлорид	96,4	91,92	4,65	++++
0,04% безетония хлорид	96,4	92,36	4,19	++++
0,01% додецилдиметилбезиламмония хлорид	96,4	90,31	6,32	++++
0,25% трикрезол	96,4	31,10	67,74	++++
0,1% крезол	96,4	24,80	74,27	++++
0,2% крезол	96,4	12,80	86,72	++++
0,5% нипагин	96,4	92,15	4,41	++++
0,5% нипазол	96,4	92,11	4,45	++++
0,5% бутабен	96,4	93,32	3,19	++++
1,0% бутабен	96,4	91,68	4,90	++++
0,5% бензойная кислота	96,4	24,40	74,69	++++
1,0% хлорбутанол-гидрат	96,4	91,95	4,62	++++
0,5% мертиолат	96,4	91,29	5,31	++++
0,5% цефиран	96,4	91,45	5,13	++++
0,5% цефирол	96,4	92,34	4,22	++++
0,02% фенилртути ацетат	96,4	91,14	5,46	++++
0,002% фенилртути нитрат	96,4	93,65	2,85	++++

Примечание: *каждый плюс – это отсутствие микробной контаминации в одном флаконе; четыре плюса – отсутствие контаминации во всех четырех опытных флаконах.

– подготовка флаконов и пробок к розливу (мойка и стерилизация);

– розлив стерильного раствора АФС в стерильные чистые флаконы;

– замораживание разлитых флаконов;

– первичная лиофилизация при отрицательной температуре;

– доосушка лиофилизата при положительной температуре;

– закупорка флаконов, извлечение из лиофильной сушки, обкатка и маркировка.

С позиций оценки возможных нарушений, которые могут приводить к нарушению стабильности и безопасности, включая нарушение стерильности и деструкцию плазмиды, можно выделить следующие критичные параметры, которые требуют детальной оптимизации (таблица 4). Стоит отметить, что возможные нарушения оценивались только в отношении стабильности и безопасности препарата, варианты отклонений в технологическом процессе, приводящие к отбраковке продукции, не рассматривались, так как не могли быть оптимизированы.

Таким образом, указанные в таблице параметры оптимизировали с целью получения максимально стабильной и безопасной ГЛФ.

2.1. Подготовка сырья. Продолжительность оттаивания. Температура оттаивания

Для оценки влияния продолжительности и температуры оттаивания растворов АФС проводили два аналитических контроля: входной контроль АФС до заморозки и выходной контроль после цикла заморозки (–15 °С в течение суток) и оттаивания, варьируя температуру разморозки и, следовательно, продолжительность процедуры. Оценивали возможное негативное влияние оттаивания, как-то: деградация продукта, потеря суперскрученности. Во всех экспериментах использовалась одна и та же АФС (серия КРП020614), содержащая 1,02 мг/мл плазмиды с чистотой 96,4% (ИО-ВЭЖХ). Оценку проводили изучая падение чистоты и/или концентрации (ИО-ВЭЖХ). Данные по результатам аналитического контроля представлены ниже (рисунок 1). Как видно из этих данных, температура и продолжительность оттаивания существенно не влияют ни на чистоту, ни на концентрацию плазмиды в растворе. Отличия в значениях чистоты и концентрации лежат в рамках воспроизводимости анализа ИО-ВЭЖХ и не являются статистически достоверными. Из чего следует сделать вывод, что размораживать АФС возможно при любой температуре в диапазоне от +4 до +36 °С. В дальнейших экспериментах оттаивание проводили при комнатной температуре.

Таблица 4.

Анализ возможных отклонений во время процесса получения ГЛФ

Этап процесса	Критичные параметры	Возможное влияние критичных параметров
Подготовка сырья	Продолжительность оттаивания. Температура оттаивания.	Нарушение третичной структуры плазмиды, образование продуктов деструкции и деградации.
Стерильная фильтрация сырья	Площадь фильтрации. Материал фильтра.	Потери вещества вследствие необратимой адсорбции на фильтре.
Подготовка флаконов и пробок к розливу	Нет параметров.	–
Розлив стерильного раствора АФС	Рабочий объем розлива по отношению к общему объему флакона.	Недостаточная эффективность лиофилизации. «Выкипание» раствора из флакона.
Замораживание разлитых флаконов	Температура заморозки. Продолжительность заморозки.	Недостаточная эффективность лиофилизации. «Выкипание» раствора из флакона.
Первичная лиофилизация	Начальная температура и градиент температуры процесса. Вакуум в камере. Температура конденсора.	Недостаточная эффективность лиофилизации. Деградация вещества при лиофилизации. «Выкипание» раствора из флакона.
Доосушка лиофилизата	Начальная температура и градиент температуры процесса.	Недостаточная эффективность лиофилизации. Деградация вещества при лиофилизации.
Закупорка флаконов, извлечение из лиофильной сушки, обкатка и маркировка	Нет параметров.	–

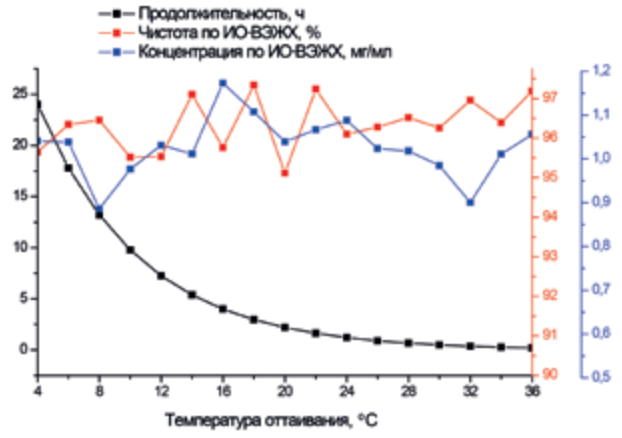


Рисунок 1. Влияние температуры оттаивания на продолжительность оттаивания и стабильность препарата

2.2. Стерильная фильтрация. Площадь фильтрации. Материал фильтра

Фильтрование на фильтрах с низкой пористостью (0,2 мкм или ниже) может быть критичным процессом в силу того, что плазмида имеет значительный размер и может «застревать» в порах фильтра. Кроме того, некоторые фильтры обладают неспецифической сорбцией в отношении таких биотехнологических продуктов, как ДНК. В связи с этим было крайне важно изучить стерильную фильтрацию АФС в течение подготовки к розливу ГЛФ, с тем чтобы минимизировать возможные потери целевого вещества. Во всех экспериментах использовалась одна и та же АФС (серия КРП020614), содержащая 1,02 мг/мл плазмиды (ИО-ВЭЖХ). Оценку проводили изучая падение концентрации после фильтрации (ИО-ВЭЖХ). Оценивали фильтры различных марок от разных производителей, сертифицированных по GMP (таблица 5). Кроме этого, оценивали нагрузочную емкость фильтрации, то есть площадь фильтрации, необходимую для фильтрации определенного количества фильтранта.

Из данных таблицы становится очевидным, что такие материалы, как PA, CN, не подходят для стерильной фильтрации растворов, содержащих ДНК. Кроме того, статистическое сравнение результатов измерений, представленных в таблице, позволяет сделать вывод, что при использовании RC во всех случаях имеет место хоть и небольшой, но процент задержки продукта на фильтре. Поэтому в остальных экспериментах можно было использовать фильтры на основе PES, SFCA, PVDF, CA. Однако выбор остановили на фильтрах

Таблица 5.

ИО-ВЭЖХ-анализ фильтрата, прошедшего через различные материалы фильтров. Пять измерений для каждого материала с оценкой среднего значения концентрации и стандартного отклонения измерений. Потери рассчитывались как отношение среднего значения измерения к исходной концентрации 1,02 мг/мл

Производитель	Материал	Изм. 1, мг/мл	Изм. 2, мг/мл	Изм. 3, мг/мл	Изм. 4, мг/мл	Изм. 5, мг/мл	Ср. зн., мг/мл	Потери, %
Sartorius, Германия	PES (полиэфирсульфон)	1,007	0,982	1,013	0,978	1,041	1,00±0,03	1,5
Sartorius, Германия	PA (полиамид)	0,419	0,482	0,463	0,393	0,491	0,45±0,04	55,9
Sartorius, Германия	RC (регенерированная целлюлоза)	1,044	1,049	0,931	0,988	0,971	1,00±0,05	2,3
Sartorius, Германия	SFCA (безсурфактантная ацетилированная целлюлоза)	1,013	1,108	1,087	0,972	1,004	1,04±0,06	–1,7
Millipore, Германия	PES (полиэфирсульфон)	0,987	0,983	1,058	0,906	1,099	1,01±0,07	1,3
Millipore, Германия	PVDF (поливинилдифторид)	1,064	1,076	1,031	1,064	0,910	1,03±0,07	–0,9
Pall, Германия	PES (полиэфирсульфон)	1,019	1,089	1,136	0,976	0,962	1,04±0,07	–1,6
Pall, Германия	PVDF (поливинилдифторид)	0,930	1,024	1,042	1,102	1,001	1,02±0,06	0
Corning, США	PES (полиэфирсульфон)	0,998	1,086	0,987	1,067	1,099	1,05±0,05	–2,7
Corning, США	CA (ацетат целлюлозы)	0,952	0,950	0,961	1,042	1,107	1,00±0,07	1,7
Corning, США	RC (регенерированная целлюлоза)	0,942	0,985	1,038	1,007	0,970	0,99±0,04	3,1
Corning, США	CN (нитрат целлюлозы)	0,097	0,147	0,082	0,211	0,092	0,13±0,05	87,7
Corning, США	PVDF (поливинилдифторид)	0,983	0,959	0,990	1,012	0,969	0,98±0,02	3,7

из PES, как наиболее доступных и дешевых. Все последующие эксперименты проводили на фильтрах из PES.

Важным показателем фильтрации является скорость. Чем быстрее проходит процесс, тем меньше вероятность деградации продукта и тем выше производительность процесса. Мы изучали скорость фильтрации для фильтров различного диаметра, оценивая емкость фильтра, то есть площадь фильтрации, необходимую для фильтрации всего количества полупродукта, а также время фильтрации. Нормальный процесс должен обеспечивать время фильтрации не выше 60 с. Однако чем больше диаметр фильтра, тем выше потери раствора из-за «мертвого» объема. Во всех экспериментах фильтровали раствор АФС в количестве 25 мл через каждый фильтр, засекая время фильтрации, а также оценивая потери в объеме (рисунок 2).

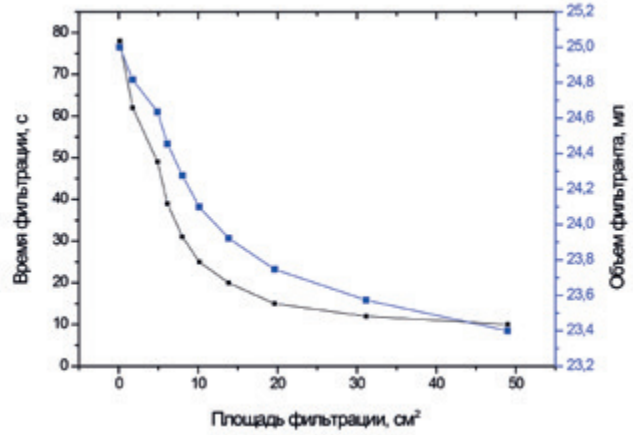


Рисунок 2. Зависимость времени фильтрации и объема фильтранта от площади фильтрации

Как видно из представленных графических данных, ни в одном из случаев не произошло «забивания» фильтра, что привело бы к необходимости его замены и увеличению времени фильтрации (1); однако при площадях ниже 8 см^2 процесс «забивания» фильтра уже начинался, что характеризовалось резким геометрическим повышением времени фильтрации (2); при слишком больших фильтрах, диаметром более 42 мм

(площадь фильтрации 13,85 см^2), потери из-за «мертвого» объема превышают 5%, это значение слишком велико (3). Таким образом, наиболее оптимальными следует считать фильтры диаметром 32 и 36 мм (площади фильтрации 8,03 и 10,17 см^2 соответственно).

Итак, для дальнейшей работы были выбраны фильтры диаметром 32 или 35 мм из материала PES (полиэфирсульфон). Через фильтр пропускали раствор АФС, а затем проверяли стерильность полученного раствора методом прямого посева на питательных средах [10]. Колоний микроорганизмов не возникало, что подтверждало стерильность отфильтрованного раствора. Отфильтрованный раствор поступал на стадию розлива во флаконы.

2.3. Розлив стерильного раствора АФС. Рабочий объем розлива по отношению к общему объему флакона

Производство различных биофармацевтических продуктов всегда осложнено их ограниченной физической и/или химической стабильностью. А в отношении ГЛФ стабильность приобретает одно из ключевых значений. Зачастую увеличить стабильность препаратов можно, превратив их в твердую форму, чего можно добиться с помощью лиофилизации. Лиофилизация, по существу являющаяся совокупностью процессов замораживания и сушки, может оказать достаточно негативное (и даже пагубное) влияние на препарат. Поэтому лиофилизация, как и любой другой процесс, нуждается в оптимизации. Лиофилизация состоит из трех основных этапов: замораживание образца, первичная сушка, доосушка. Подготовительным этапом перед замораживанием образца является розлив стерильного раствора в подготовленные (мытые и стерилизованные) флаконы. Критичным параметром является объем образца, который попадает во флакон. Если раствор образца будет занимать слишком большую часть объема флакона, то время лиофилизации может значительно увеличиваться. Кроме того, возможно «выкипание» избыточного объема раствора из флакона как в самом начале лиофилизации, так и при переходе к третьему этапу, доосушке. Если же объем раствора во флаконе будет слишком мал, то потребуется большое число флаконов, что сильно увеличивает себестоимость продукта не столько из-за стоимости дополнительных флаконов и операций по их подготовке, сколько из-за стоимости хранения и логистики.

Поэтому задачей оптимизации этапа розлива является подбор максимального рабочего объема образца во флаконе, который будет с достаточной эффективностью лиофилизироваться без «выкипания». Под эффективной лиофилизацией мы понимаем процесс, который занимает не более 50 ч и приводит к получению продукта с остаточной влажностью не более 10%.

Во всех экспериментах использовали АФС (серия КРП020614) и инсулиновые флаконы вместимостью 5 мл. Оценивали влияние приведенного рабочего объема раствора АФС во флаконах (то есть отношение объема раствора к общему объему флакона в % об.) на остаточную влажность в лиофилизате (при одинаковой программе лиофилизации: длительности 49 ч и вакууме не более 0,06 мбар – см. далее). Эксперимент проводили для десяти флаконов для каждого приведенного объема (таблица 6).

Анализируя данные результатов контроля остаточной влажности методом титрования по Фишеру, можно сделать выводы, что заполнение флакона больше чем на 35% его общего объема приводит либо к «выкипанию» образца при старте лиофилизации, либо к оттаиванию образца на момент запуска доосушки вследствие недостаточно эффективной лиофилизации (часть влаги, которая осталась в полусухом продукте, размораживается при доосушке и уже не испаряется). Наполняемость флакона на 35% от общего объема является граничным: несмотря на то, что образец во всех флаконах высушился без «выкипания» и оттаивания, есть флаконы, которые должны быть отбракованы из-за слишком высокого содержания остаточной влажности – таких флаконов три, то есть брак на этом этапе при таком заполнении флакона составляет 30%. Нами было решено, что флакон должен заполняться не более чем на 30% от общего объема. В этом случае можно гарантировать низкое содержание остаточной влаги, отсутствие «выкипания» и/или оттаивания.

2.4. Замораживание разлитых флаконов. Температура заморозки. Продолжительность заморозки

Первый этап лиофилизации – заморозка: образец замораживают с тем, чтобы перевести воду в лед. Этот этап получил название «витрификация», т.е. процесс перевода образца в стеклоподобное твердое аморфное состояние [11]. В течение этого этапа вода начинает превращаться в кристаллы, уходя из системы, тем самым белок концентрируется, что способствует быстрому повышению вязкости, переводящему образец в аморфное состояние. Критичными параметрами процесса являются температура стеклования образца (glass-transition temperature, Tg), ниже которой резко снижается молекулярная подвижность молекул образца в растворе, а также скорость замораживания образца [12]. Последняя может существенно влиять на окончательный вид конечного лиофилизированного препарата, хотя до конца не ясно, в соответствии с каким механизмом. Предполагается, что скорость замораживания влияет на размер и количество образующихся кристаллов, которые, в свою очередь, определяют пористость высушиваемого слоя образца [13]. Чем выше число кристаллов и, следовательно, меньше

Таблица 6.

Анализ влияния приведенного объема образца во флаконе на остаточную влажность после лиофильной сушки

	Приведенный объем во флаконе, %	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Остаточная влажность во флаконе, %	фл.1	1,01	1,57	1,75	2,51	4,51	7,39	9,88	ООО	17,61	ВВВ
	фл.2	1,05	1,59	1,75	2,40	4,40	7,50	10,17	12,71	ООО	ВВВ
	фл.3	0,91	1,68	1,65	2,57	4,52	7,47	9,82	12,82	ВВВ.	ВВВ
	фл.4	0,99	1,55	1,72	2,60	4,44	7,46	9,92	12,95	17,70	ВВВ
	фл.5	1,00	1,60	1,67	2,45	4,47	7,58	9,91	13,05	ООО	ВВВ
	фл.6	1,03	1,54	1,76	2,45	4,45	7,70	9,90	12,72	ООО	ВВВ
	фл.7	1,00	1,60	1,70	2,54	4,52	7,53	10,21	12,85	ООО	ВВВ
	фл.8	0,90	1,61	1,59	2,50	4,48	7,65	9,97	12,21	17,55	ВВВ
	фл.9	0,97	1,68	1,74	2,47	4,45	7,48	10,02	12,76	ООО	ВВВ
	фл.10	1,05	1,68	1,72	2,50	4,54	7,51	9,90	12,60	ООО	ВВВ

Примечание: ООО – оттаивание образца в момент запуска доосушки;
ВВВ – «выкипание» образца в момент запуска лиофилизации.

пористость, тем дольше будет длиться процесс первичной сушки. Таким образом, в рамках оптимизации этапа заморозки исследовалось влияние скорости заморозки (точнее, времени и температуры заморозки) на длительность лиофилизации. Замораживали три флакона, наполненных не более чем на 30% общего объема. В один флакон помещали датчик влажности. Лиофилизацию вели до показателя влажности в контролируемом (с онлайн-датчиком измерений) флаконе 8% (так как датчик влажности имеет погрешность измерений 1%). Время, требуемое для лиофилизации указанной партии, вносили в журнал показаний. Затем вели процесс для другой партии флаконов, замороженных при других условиях. Всего изучали 49 различных условий (температура от –70 до –10 °С и время заморозки от 2 до 8 ч). Флаконы, влажность содержимого которых не достигала 10%, отбраковывались и в расчетах не участвовали (1 флакон с влажностью по методу Фишера 10,3%). Затем по значениям в журнале показаний строили графическую зависимость времени лиофилизации от времени заморозки и температуры заморозки (рисунок 3).

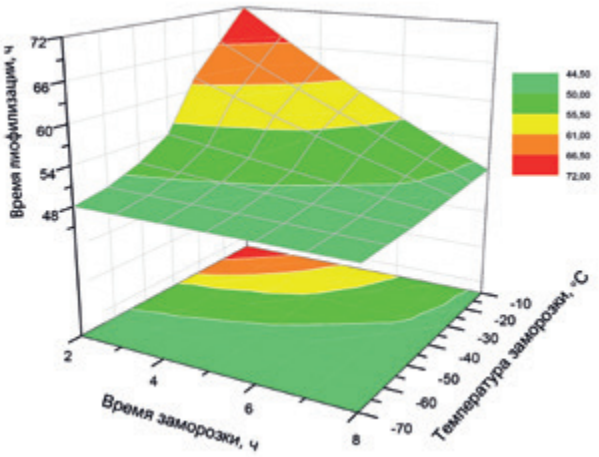


Рисунок 3. Влияние времени и температуры заморозки на время лиофилизации

По результатам эксперимента были сделаны следующие выводы: 1) аморфность кристаллизации суперскрученной плазмиды, а следовательно, время сублимации очень сильно зависит от температуры заморозки; при температурах выше –40 °С вести заморозку нецелесообразно, так как это приводит к слабой аморфности кристаллов льда в образце, лиофилизированный образец выглядит как монолитная таблетка, поры невооруженным глазом не заметны; процесс идет долго, дольше 60 ч; 2) при высоких температурах (–40 °С) процесс заморозки занимает много времени (больше 6 ч), что неудобно для планирования производства; 3) оптимальным режимом заморозки является следующий: температура ниже –55 °С, время 2 ч.

2.5. Первичная лиофилизация. Начальная температура и градиент температуры процесса. Вакуум в камере. Температура конденсора

После замораживания образец подвергают первичной сушке, а точнее, сублимации ледяной воды за счет создания вакуума. Помимо вакуума, критическим параметром процесса является еще и величина температуры. Она должна быть ниже Tg, чтобы предотвратить плавление льда и не нарушить стеклоподобное состояние препарата. В противном случае увеличивающаяся подвижность молекул белка может приводить к фазовому разделению, нарушающему массоперенос [14]. Первичная сушка является наиболее продолжительным этапом всего процесса. Поэтому оптимизация первичной сушки очень важна, хотя и затруднительна, так как процесс занимает очень много времени.

В рамках оптимизации варьировались следующие параметры в программе лиофилизационного процесса: температура полок на старте, градиент температур полок, время исполнения градиента, глубина вакуума. Постоянным поддерживалось значение температуры конденсера (–84 °C). Было опробовано четыре различных варианта программ (рисунки 4–7), каждый из которых позволил получить высушенный продукт (влажность ниже 10%). Продукт после лиофилизации подвергался аналитическому контролю методами ИО-ВЭЖХ и ЭФ: оценивалась возможность деградации продукта при сублимации. Для этого лиофилизированную ГЛФ, полученную в результате запуска той или иной программы, растворяли в 1 мл физраствора и проводили анализы (таблица 7).

Как видно из представленной таблицы, градиенты температуры полок и вакуума оказались не очень

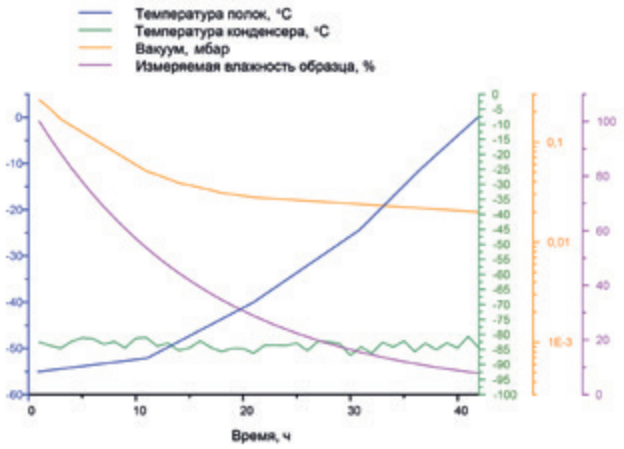


Рисунок 4. Программа первичной сушки № 1

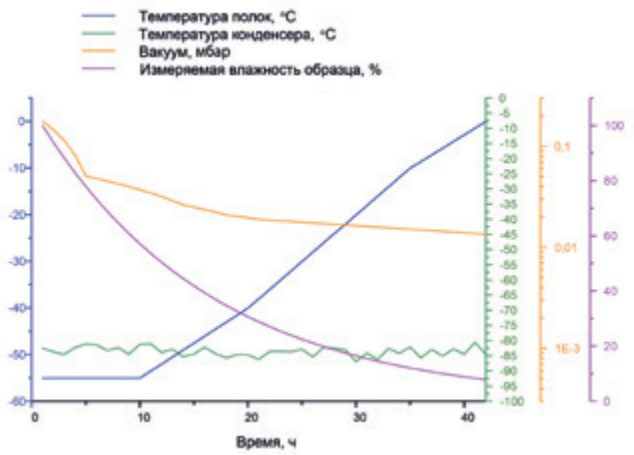


Рисунок 5. Программа первичной сушки № 2

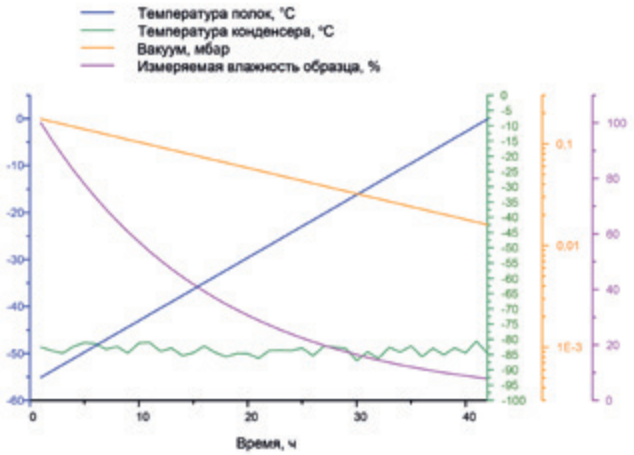


Рисунок 6. Программа первичной сушки № 3

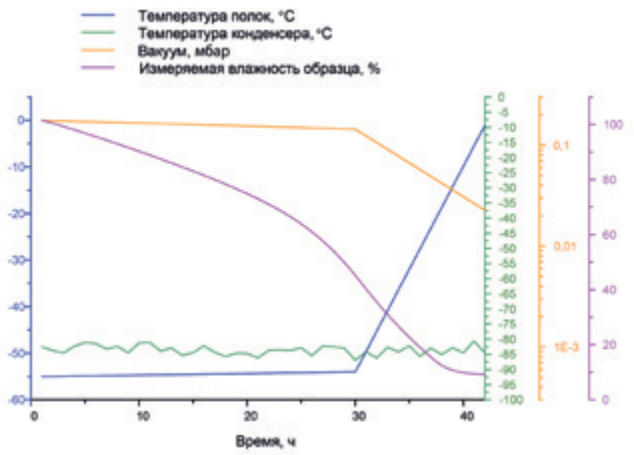


Рисунок 7. Программа первичной сушки № 4

удачными в случае второй и третьей программ. Потери целевой ДНК при высушивании особенно хорошо заметны на электрофорезе (рисунок 8).

Наиболее удачными результатами, как нам показалось, следует считать результаты программы № 1

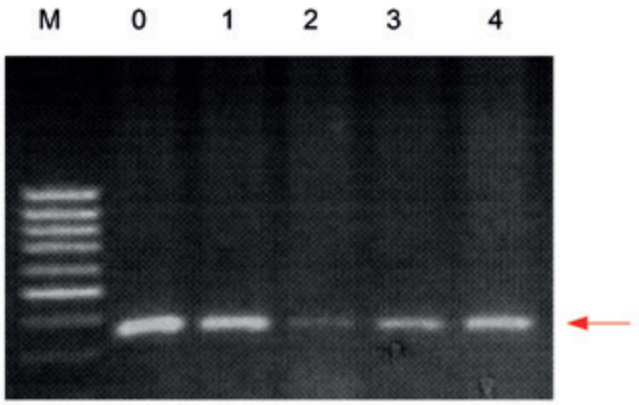


Рисунок 8. **ЭФ (М – маркеры молекулярных весов; 0 – АФС до лиофилизации; 1 – первая программа лиофилизации; 2 – вторая программа; 3 – третья программа; 4 – четвертая программа)**

Таблица 7.

Результаты аналитического контроля лиофилизата, полученного с помощью той или иной программы процесса

	Программа № 1	Программа № 2	Программа № 3	Программа № 4
ИО-ВЭЖХ, %	96,6	94,2	96,1	96,5
ИО-ВЭЖХ, мг/мл	1,01	0,92	0,98	1,00
ЭФ, денситометрический расчет, %	98,1	97,5	98,0	98,1

2.6. Доосушка лиофилизата. Начальная температура и градиент температуры процесса

Чем ниже температура, тем медленнее обезвоживание образца. Ускорить процесс позволяет последний этап, доосушка. Физический смысл этого шага заключается в том, что за счет подвода избыточного тепла ускоряется испарение остаточной воды образца.

Однако подвод тепла должен компенсироваться повышением температуры полок. В результате повышения температуры полок и длительности процесса образец, который прогревается медленнее полок, попадает в градиент температур. Задача оптимизации этого этапа – избежать длительного воздействия высоких температур на продукт. Для этого оптимизируется время доосушки и градиент повышения температуры полок. Оцениваются, с одной стороны, время, которое образец находится при избыточно высокой температуре (выше +37 °С, измеряется с помощью термодатчика, опущенного в образец), а с другой – чистота полученной ГЛФ, то есть степень ее деградации.

Анализируя данные, полученные в ходе различных экспериментов с перегревом полок (рисунок 9), мы смогли установить, что оптимальный диапазон температур полок – от 40 до 46 градусов, а оптимальное время доосушки – от 5 до 9 ч.

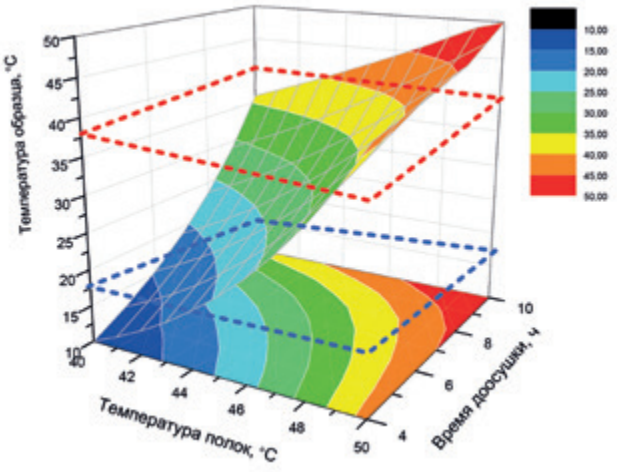


Рисунок 9. **Влияние температуры полок и длительности прогрева на температуру образца. Красный ободок отсекает область, в которой образец подвергается критичному перегреву, а синий ободок отсекает область, в которой образец прогревается недостаточно**

Внутри этих диапазонов образец не подвергался деградации, что подтверждалось данными ИО-ВЭЖХ и электрофореза (не было потери чистоты или концентрации плазмиды). В дальнейшей работе было решено использовать средние значения диапазонов: доосушка в течение 7 ч при 43 градусах.

Итак, был разработан способ получения лиофилизированной ГЛФ. Опытные флаконы (пять штук) с лиофильно высушенной таблеткой препарата хранились в течение месяца в некатегорируемом помещении на лабораторном столе при комнатной температуре. Затем в каждый флакон вводили шприцем физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме 1 мл, тщательно перемешивали и проводили аналитические контроли методами ИО-ВЭЖХ и прямым посевом на питательную среду Сабуро. Результаты ИО-ВЭЖХ-анализа оценивали сразу, а результаты прямого посева – через пять дней после инкубирования при комнатной температуре. Во всех образцах концентрация плазмиды составила 1,0±0,05 мг/мл, чистота – 96,2±0,1%. Все образцы оказались стерильными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был разработан состав ГЛФ на основе суперскрученной плазмидной ДНК. Форма представляет собой стерильный закупоренный резиновой пробкой флакон 5 мл с лиофильно высушенной плазмидой 1 мг. Пробку флакона следует проткнуть стерильной апирогенной иглой от медицинского шприца, а затем рядом с местом укола проткнуть флакон второй раз иглой, надетой на шприц, заполненный 1 мл 0,9% NaCl, ввести содержимое шприца во флакон и тщательно перемешать до получения прозрачного бесцветного раствора. Проткнуть иглой без шприца пробку необходимо по той причине, что внутри флакона отсутствует воздух (флакон закупоривается под вакуумом в камере лиофильного агрегата).

Такая форма препарата подтвердила свою стабильность, стерильность, апирогенность, изотоничность (за счет 0,9% NaCl) и может быть использована для инъекционного введения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.А. Савищенко, С.С. Илисавский, А.И. Гинак, Т.Д. Алейникова, М.М. Шавловский. Наночастицы на основе производных гидрокортизона в качестве векторов доставки генетического материала в эукариотические клетки *in vivo* // Биотехнология. 2009. Т. 1. С. 31–38.
2. Неоваскулген. URL: http://hsci.ru/produkty-i-uslugi/neovaskulgen (дата обращения 20.01.2016).
3. Ю.А. Жогина, Д.В. Глазкова, А.С. Ветчинова, Е.В. Богословская, Г.М. Цыганова, Г.А. Шипулин. Сравнительная оценка активности различных генетических конструкций, направленных на подавление репликации ВИЧ-1 // Биофармацевтический Журнал. 2014. Т. 6(5). С. 11–18.
4. П.В. Михайлов, Е.К. Курбанова, В.Д. Гусарова, А.М. Лящук, Ю.Н. Новиков, Д.А. Гусаров. Периодический режим культивирования бактериального продуцента E. coli с подпиткой для продукции генно-терапевтической суперскрученной плазмиды // Биофармацевтический Журнал. 2014. Т. 6(3). С. 31–35.
5. J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. Gel electrophoresis of DNA. In Molecular Cloning: a Laboratory Manual. – N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989. Chapter 6.
6. Потеря в массе при высушивании // Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. Ч. 1. – М. 2007.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII издание. Ч. 1. – М. 2007.
8. ОФС 42-0075-07 // Государственная фармакопея XII, Ч.1. – М. 2007.
9. ОФС 42-0066-07 // Государственная фармакопея XII, Ч.1. – М. 2007.
10. Контроль стерильности методом прямого посева // Государственная фармакопея СССР. XI издание. Ч. 2. – М. 1989.
11. M.J. Maltesen, M. van de Weert. Drying methods for protein pharmaceuticals // Drug Discovery Today: Technologies. 2008. V. 5. № 2-3. P. e81-e88.
12. S. Bhattacharya, R. Suryanarayanan. Local mobility in amorphous pharmaceuticals-characterization and implications on stability // J. Pharm. Sci. 2009. V. 98. № 9. P. 2935–2953.
13. M.J. Pikal. Freeze Drying // Encyclopedia of Pharmaceutical Technology / Ed. by J. Swabrick, J.S. Boyland. – N.Y.: Marcel Dekker, 2001.
14. S. Tsinontides, P. Rajniak, D. Pham, W. Hunke, J. Placek, S.D. Reynolds. Freeze Drying – Principles and Practice for Successful Scale-up to Manufacturing // Int. J. Pharm. 2004. V. 280. P. 1–16.



УДК 615.012.6

1 – Научно-производственная биотехнологическая платформа «ЭкспертБИОТЕХ», 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, 18

1 – R&D and Pilot Plant Biotechnological Platform «ExpertBIOTECH», 18, Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail:
dmitriy.gusarov@expert-biotech.com

ВИРУСНАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Д.А. Гусаров[1]*

Резюме. Терапевтические препараты, получаемые из эукариотических биопродуцентов, могут нести в себе груз природных контаминантов, среди которых наиболее опасные для здоровья человека – вирусы. В статье поднимается проблема вирусной безопасности биофармацевтических лекарственных средств. Представлена схематическая стратегия стадий даунстрим-процесса, гарантирующих вирусную безопасность препаратов. Дано описание таких методов, как вирусная инактивация, фильтрация, очистка.

Ключевые слова: вирусы, биобезопасность, инактивация, нанофильтрация, хроматография.

VIRAL BIOSAFETY OF BIOPHARMACEUTICALS

D.A. Gusarov[1]*

Abstract. Therapeutics produced by eukaryotic cell lines could possible be contaminated with bioburden; the most dangerous for human is viral contamination. The article describes the problem of viral safety of biopharmaceuticals. The strategy of downstream process steps for the viral safety guarantee is discussed. The methods of viral inactivation, filtration, purification are given in the paper.

Keywords: viruses, biosafety, inactivation, nanofiltration, chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в фармобращении происходит революционное увеличение количества разрабатываемых и уже представленных на рынке биофармацевтических лекарств, таких как рекомбинантные белки, моноклональные антитела, препараты из донорской крови [1–3]. На сегодняшний день большая часть таких препаратов – это белки, получаемые с помощью технологии рекомбинантных ДНК и гибридомной технологии [4]. При этом биофармацевтические лекарства эволюционируют: с каждым днем появляется все большее количество сложных, больших молекул с посттрансляционными модификациями. Неудивительно, что растет популярность эукариотических хост-платформ для биосинтеза таких препаратов [5, 6]. Однако эукариотические платформы, в особенности на основе линий клеток млекопитающих, могут нести опасный груз природных контаминантов, к которым относятся вирусы, прионы, микоплазма.

С точки зрения европейских регуляторов, производитель должен гарантировать абсолютное отсутствие вирусов в биофармацевтических продуктах [7–10].

Такую гарантию можно дать только при обязательном выполнении следующих условий:

– использование биобезопасных материалов и сырья;

– аттестация клеточных линий до создания музея и в течение его сохранения;

– использование валидно эффективной стратегии даунстрим-процесса;

– тщательный внутриоперационный контроль.

Цель этой статьи – рассмотреть стратегию даунстрим-процесса, которая может гарантировать избавление от потенциальной вирусной контаминации.

ДАУНСТРИМ-ПРОЦЕСС

Даунстрим-процесс представляет собой цепочку шагов, которая гарантирует удаление нежелательных примесей при сохранении целевого продукта, и стратегия очистки от вирусов (размер вирусов от 20 до 300 нм) является его неотделимой частью.

Типичный даунстрим-процесс для выделения и очистки, например, моноклональных антител выглядит следующим образом:

1) сбор и осветление культуральной жидкости (обычно глубинная фильтрация, центрифугирование и/или микрофильтрация);

2) capture антител (protein-A-хроматография) – удаление HCP (остаточные белки продуцента) и ДНК;

3) вирусная инактивация при низком pH (также осаждаются HCP, но нужно учитывать стабильность продукта);

4) ионообменная хроматография как этап полишинга (для удаления агрегатов, эндотоксинов, нежелательных белков, вирусов);

5) концентрирование, перебуферирование (тангенциальная фильтрация);

6) ультра-, диа- и/или нанофильтрация для удаления оставшихся вирусов.

При этом требования нормативных актов (в первую очередь FDA) таково, что очистка от вирусов должна обеспечиваться введением в технологию как минимум двух ортогональных (базирующихся на различных принципах) методов, каждый из которых снижает содержание вирусов (лог вирусов) как минимум на два порядка [11, 12].

Рассмотрим ***вероятные источники вирусной контаминации*** (рисунок 1). Это может быть используемое сырье, включая технические газы (воздух, кислород, CO_2) и питательную среду, сам биореактор и, что наиболее вероятно, клеточная линия.



Рисунок 1. Вероятные источники вирусной опасности

Наилучшей методикой для снижения вирусной контаминации является предотвращение доступа случайных агентов в биореактор. Это достигается интенсивной проверкой клеточных линий, сырья (включая культуральные среды) на отсутствие вирусов. В общих чертах, производство сейчас отходит от использования добавок животного происхождения (например, сывороток, трансферринов, ростовых факторов). В частности, сыворотка КРР может быть заражена реовирусом, вирусом эпизоотической геморрагической болезни, везивирусом 2117, свиным трипсином – свиным цирковирусом, а другие компоненты сред – minute virus of mice (MVM). Во многих случаях при предварительном рутинном анализе сырья вирусы могут быть не обнаружены из-за недостаточной чувствительности методов, а также из-за того, что некоторые компоненты (антивирусные антитела) могут вызывать ингибирование.

Для обработки сырьевых материалов используются следующие методики, хотя они не являются обязательными:

– облучение γ-радиацией;

– инактивация UV-C;

– технология HTST (high temperature-shot time).

Опять же существует выход: использовать рекомбинантные или произведенные в растениях компоненты сред (трипсин, ростовые факторы).

Рассмотрим ***методы избавления от вирусов*** (рисунок 2). Эти методы можно разбить на две группы: инактивация вирусов и очистка от вирусов.

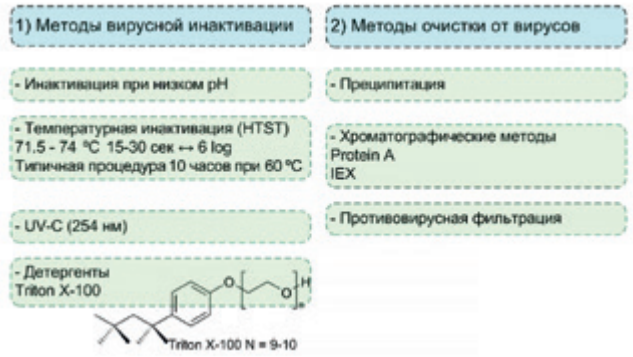


Рисунок 2. Методы избавления от вирусов

Вирусная инактивация

Может быть проведена за счет изменения pH (рисунок 3). В кислых условиях вирусы инактивируются, причем чем более низкий pH, тем лог инактивации вирусов ниже. Чем дольше время воздействия низкими pH, тем выше эффективность процесса. Некоторые вирусы при низком pH могут спонтанно денатурировать, таким образом, низкие значения pH можно использовать для вирусной инактивации тех белков, которые более устойчивы в данных условиях, чем вирусы. Данный метод эффективен в отношении вирусов с оболочкой (капсидом), для других вирусов его нужно совмещать с увеличением температуры. Как правило, типичными условиями pH-инактивации является выдерживание раствора белка при pH 4 в интервале от 6 ч до 21 дня.

Может быть проведена за счет жесткого облучения ультрафиолетом (рисунок 3), разрушающим

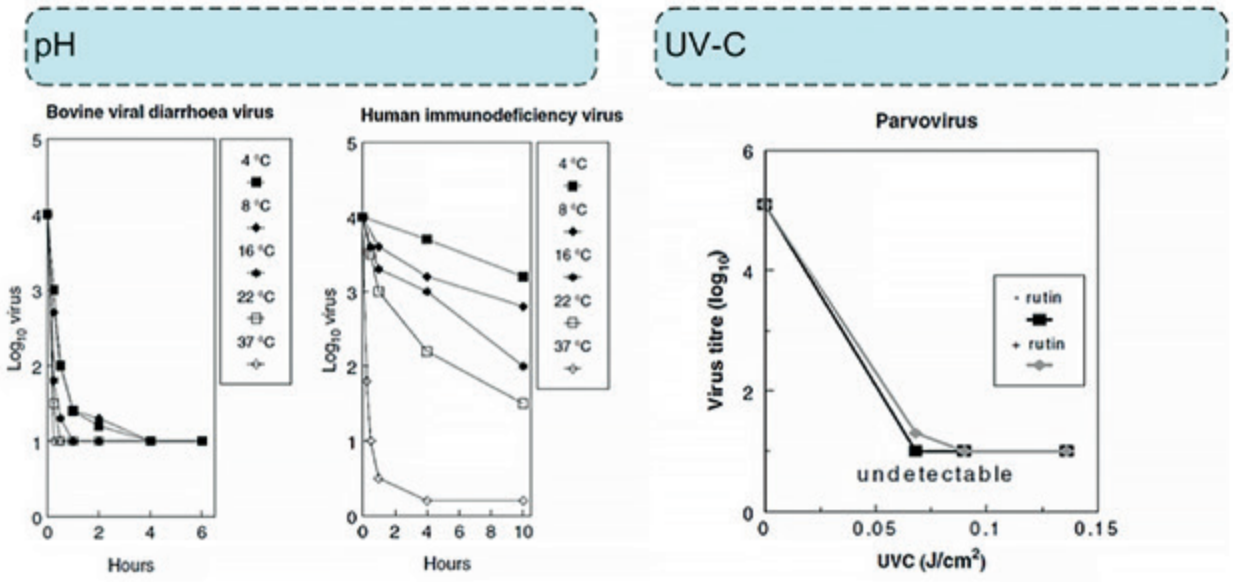


Рисунок 3. **pH- и УФ-инактивация вирусов**

генетический материал под капсидом вируса. УФ-лучи могут разрушать ДНК, приводя к образованию димеров нуклеиновых кислот. Этого практически не происходит в тканях, так как УФ-лучи плохо через них проникают, однако вирусные частицы малы и УФ-лучи могут достичь их генетического материала, разрушить ДНК, в результате чего вирус не может реплицироваться.

Инактивация детергентами. Эффективна только для вирусов с липидными оболочками, которые разрушаются под действием детергентов. Как правило, используется Тритон X-100, Tween-80.

Преципитация

Для преципитации вирусов используются органические растворители: этанол, TNBP и проч. Эффективна против капсидных и некапсидных вирусов, в частности против парвовируса B19. Типичный пример – многократная преципитация этанолом (рисунок 4).

Противовирусная нанофильтрация

Это самый эффективный и наиболее надежный метод. Фильтрация может быть только в тупиковом режиме (тангенциальный режим хотя на практике и возможен, запрещен по правилам GMP). Используются фильтры с диаметром пор 20 нм. Это связано со средним размером вирусных частиц. Кстати, самый маленький вирус – парвовирус – имеет размер 18–24 нм.

Ниже перечислены коммерчески доступные противовирусные фильтры (таблица 1). Фильтры для очистки от вирусов можно в общих чертах разделить на две категории:

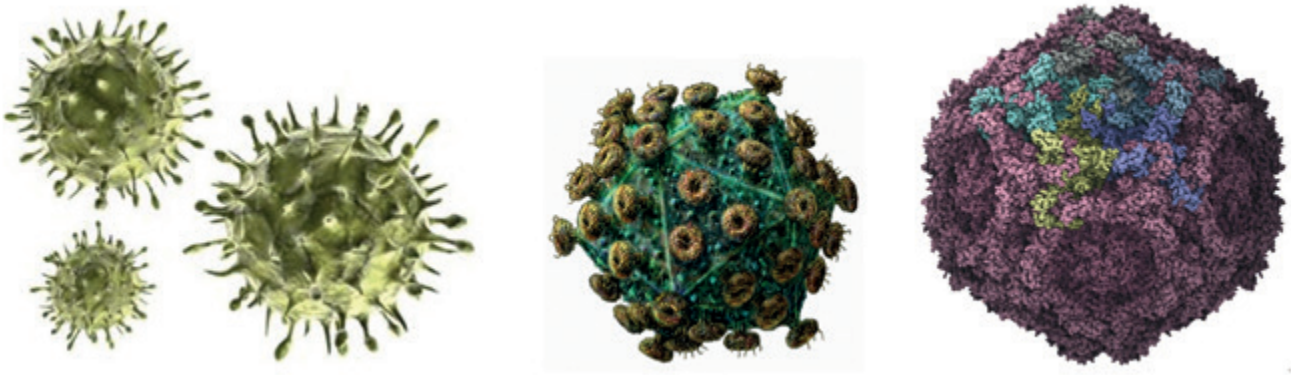


Рисунок 4. **Снижение лога для пяти различных вирусов на протяжении четырех этапов преципитации при производстве иммуноглобулина**

1) фильтры, которые обеспечивают >4 или >6 порядков снижения содержания больших вирусов, обычно это эндогенные ретровирусы размером 80–100 нм;

2) фильтры, которые обеспечивают >4 порядков снижения содержания маленьких и больших вирусов, имеющих больший размер, чем парвовирусы.

Таблица 1.

Наиболее известные противовирусные фильтры

Компания	Продукт	Virus Retention	Размер вирусов, нм
Asahi-Kasei	Planova 15N	> 6,2 log Parvovirus > 6,7 log Poliovirus	18–26 28–30
	Planova 20N	> 4,3 log Parvovirus > 5,4 log Encephalomyocarditis	18–26 28–30
	Planova 35N	> 5,9 log Bovine Viral Diarrhea virus > 7,3 log HIV	40–70 80–130
Millipore	Viresolve NFP	> 4,0 log φχ-174 bacteriophage	28
	Viresolve NFR	> 6,0 log Retrovirus	80–130
Pall	ULtipor DV20	> 3,0 log PP7 bacteriophage > 6,0 log RP772 bacteriophage	26 76–88
	ULtipor DV50	> 6,0 log RP772 bacteriophage	76–88
Sartorius	ViroSart CPV	> 4,0 log PP7 bacteriophage > 6,0 log Retrovirus	26 80–130

Парвовирусы имеют диаметр 18–24 нм, в то время как обычные моноклональные IgG-антитела имеют гидродинамический радиус 8–12 нм. Для достижения снижения содержания вирусов на 4 порядка и выхода белка более 99% у фильтров для очистки от парвовирусов должен быть очень узкий диапазон разброса размера пор. Поэтому они крайне чувствительны к присутствию различных примесей в растворе белка. Таким образом, при оптимизации процесса противовирусной фильтрации нужно учитывать большое число параметров.

Еще один интересный пример противовирусных фильтров – глубинные фильтры Zeta Plus™ VR, которые производитель рекомендует использовать на финальных этапах очистки продукта перед стерильным филлингом. Номинальный размер пор данных фильтров больше, чем самые маленькие животные вирусы, поэтому рабочим механизмом в данном случае является ионный обмен: на поверхности матрицы находится катионный модификатор, который обеспечивает электрокинетический захват вирусов в комбинации с адсорбцией. В данном случае ученые пытались очистить раствор моноклональных антител от xenotropic murine leukemia virus xMuLV (90нм) и Porcine Parvovirus (PPV 30нм) в 20мМ ацетатном буфере (pH 5.0). Результаты ниже (измеряемая величина – снижение на порядок) (рисунок 5).



Рисунок 5. Глубинные фильтры Zeta Plus™ VR

Хроматография

Однозначного рецепта использования хроматографии в качестве универсального средства избавления биофармацевтических продуктов от вирусов, к сожалению, нет. В теории ионообменная хроматография (причем как анионообменная – АОХ, так и катионообменная – КОХ) может снижать лог от двух до пяти за счет того, что вирусные капсиды имеют как положительные, так и отрицательные заряды [13]. Однако стоит отметить, что последовательное применение АОХ и КОХ не может, с точки зрения регуляторов, считаться использованием двух ортогональных методов.

Кроме того, вирусные капсиды, как и большая часть белков, имеют гидрофобные домены – вероятностно, что чем больше размер вирусной частицы, тем выше ее гидрофобность. Поэтому хроматография гидрофобных взаимодействий, а также обращенно-

фазовая хроматография позволяют снизить лог от четырех до семи.

Аффинная хроматография хотя гипотетически может снижать лог вирусов, не считается эффективным инструментом для избавления от вирусов.

Гель-фильтрация в теории может отделить целевую фракцию рекомбинантных белков от более крупных вирусных частиц. Однако биофармацевтические лекарственные молекулы, производимые в эукариотических культурах клеток, довольно большие – 8–12 нм. На практике разрешающей способности гель-фильтрационных сорбентов для эффективного отделения молекулы размером 8–12 нм от парвовируса диаметром 18–24 нм явно недостаточно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стратегия даунстрим-процесса выделения и очистки биофармацевтического лекарственного средства должна гарантировать вирусную безопасность, для чего в технологической схеме должно быть как минимум две ортогональные стадии эффективного избавления от вирусов. Схема, включающая в себя pH-инактивацию, вирусную фильтрацию и ионообменную хроматографию, позволит снизить гипотетическое вирусное загрязнение на 8-15 порядков. Схема, включающая преципитацию, ионообменную хроматографию и нанофильтрацию, снижает контаминацию на 11–16 порядков.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.В. Исеркапов, А.Л. Берковский, И.Д. Гурвиц, Н.С. Шастина, В.И. Швец. Изучение активации протромбинового комплекса для получения фактор-VIII-байпасной активности // Биофармацевтический журнал. 2014. Т. 6(5). С. 19–24.
2. Д.А. Гусаров, А.Ф. Миронов, В.И. Швец. Стратегия производственной технологии биофармацевтических лекарств // Биофармацевтический журнал. 2014. Т. 6(5). С. 25–37.
3. И.Е. Шохин, Т.А. Ярушок, Ю.В. Медведев, А.Ю. Савченко, Г.В. Раменская, Е.А. Малашенко. Биофармацевтическая классификация стратегически значимых лекарственных средств // Биофармацевтический журнал. 2015. Т. 7(5). С. 30-34.
4. K.M. Remington. Fundamental Strategies for Viral Clearance. Part 1: Exploring the Regulatory Implications // Bioproc. Int. 2015. V. 13(1). P. 10–16.
5. Д.А. Гусаров. Концепция биосинтеза терапевтических белков в клетках млекопитающих // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4(13). С. 114–121.
6. Б.Б. Сысуев, Ю.С. Покровская. Рекомбинантные микроорганизмы и клеточные культуры в технологии получения препаратов белков // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4(13). С. 96–109.
7. Note for Guidance on Validation of Virus Removal and Inactivation Procedures: Choice of Viruses EU 3AB9A, July 1995. URL: http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-3/pdfs-en/3ab9aen.pdf (дата обращения 20.01.2016).
8. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin ICH Q5A, March 1997, rev. September 1999. URL: www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html (дата обращения 20.01.2016).
9. Plasma-Derived Medicinal Products EU 3AB12A, rev 3, January 2001. URL: http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-3/pdfs-en/3ab12aen.pdf (дата обращения 20.01.2016).
10. Setting Standard of Quality and Safety of the Donation, Procurement, Testing, Processing, Preservation, Storage, and Distribution of Human Tissues and Cells. Directive 2004/23/EC, 31 March 2004. URL: http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2004/l_102/l_10220040407en00480058.pdf (дата обращения 20.01.2016).
11. Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. FDA/CBER, February 1997. URL: www.fda.gov/cber/gdlns/ptc_mab.pdf (дата обращения 20.01.2016).
12. Guidance for Industry on Monoclonal Antibodies Used as Reagents in Drug Manufacturing. FDA/CDER, March 2001. URL: www.fda.gov/cder/guidance/3630fnl.htm (дата обращения 20.01.2016).
13. C. Scott. Methodologies for Viral Safety // Bioproc. Int. 2005. P. 30–38.



В новом издании обсуждаются ключевые направления развития биофармацевтической отрасли как в нашей стране, так и зарубежом

В книге находят отражение вопросы разработки и внедрения технологии получения лекарственных соединений из биопродуцентов, проектирования и обеспечения качества биофармацевтической продукции посредством внедрения принципа Quality by Design, выбора технологического и аналитического оборудования для биофармы, а также описаны стандартные решения, ускоряющие разработку и делающие технологические процессы эффективнее и производительнее

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

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

8 800 333–42–24
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК
ПО РОССИИ 24 ЧАСА)

При поддержке

Pharmcontract® group of companies

В сотрудничестве

GE Healthcare

УДК 615.25

1 – Государственный научный центр Российской Федерации ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИгенетика»), 117545, Россия, г. Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1

1 – Scientific Center of Russian Federation «Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms», 1, 1st Dorozniy proezd, Moscow, 117545, Russia

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

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ ВАКЦИН ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ (ОБЗОР)

М.А. Жученко[1]*

Резюме. Профилактика заболеваний, ассоциированных с вирусом папилломы человека, на сегодняшний день осуществляется двумя лицензированными вакцинами – «Гардасил» и «Церварикс», содержащими в качестве антигена вирусоподобные частицы на основе главного капсидного белка L1. Свойства L1 не позволяют обеспечить защиту от всех патогенных штаммов ВПЧ, демонстрируют низкую эффективность при вакцинации пациентов среднего и пожилого возрастов и не являются терапевтически эффективными. Следующее поколение вакцин, содержащих консервативные эпитопы минорного белка L2, а также онкобелки E6 и E7, обещают предоставить широкую защиту от всех ВПЧ, препятствуя как возникновению, так и распространению кожных новообразований.

Ключевые слова: ВПЧ, VLP, L1, L2, E6, E7, БТШ, вакцина.

THE RECOMBINANT ANTIGENS FOR VACCINES FOR THE TREATMENT OF PAPILLOMAVIRUS (REVIEW)

M.A. Zhuchenko[1]*

Abstract. Two licensed vaccines Gardasil and Cervarix, containing main capsid protein L1 virus-like particles antigen, are used for prevention of diseases associated with human papilloma virus. L1 cannot provide protection against all pathogenic strains of HPV, shows low efficacy in middle and old age vaccinated patients, and are not therapeutically effective. The next generation of vaccines that contain minor protein L2 conserved epitopes as well as oncoproteins E6 and E7 promise to provide broad protection against all HPV, and prevent the emergence and spread of skin lesions.

Keywords: HPV, VLP, L1, L2, E6, E7, HSP, vaccine

ВВЕДЕНИЕ

Иммунологическая специфичность и клеточная память лежат в основе принципа вакцинации, направленного на создание более быстрого и эффективного вторичного иммунного ответа [1]. Эволюция представлений о структуре и свойствах антигенов вакцин позволяет классифицировать их на несколько поколений. Первое поколение – живые, инактивированные, корпускулярные и химические вакцины – представлено препаратами микроорганизмов, аттенуированных различными типами воздействий [2]. Несмотря на значительную эффективность ряда вакцин первого поколения, их основными критическими недостатками остаются риски реверсии вирулентности, высокое содержание клеточного балласта, высокая реактогенность, присутствие остаточного количества химических инактиваторов и вирусов-контаминантов, затруднённый контроль качества при промышленном производстве [3].

Развитие биотехнологии и генной инженерии послужило импульсом для разработки вакцин второго поколения. Биосинтетические вакцины представлены рекомбинантными белками, соответствующими аминокислотным последовательностям тех структур вирусного или бактериального белка, которые распознаются иммунной системой и вызывают иммунный ответ. Подобные вакцины лишены недостатков вакцин первого поколения и способны вызывать иммунный ответ узкой специфичности. Несмотря на меньшую эффективность вакцин второго поколения вследствие меньшей иммуногенности искусственно созданных участков в сравнении с исходным вирусом, комбинированное использование нескольких иммуногенов способно обеспечить высокий иммунный ответ при существенном снижении реактогенности и побочного действия вакцины [4].

Считается, что все профилактические вакцины работают по механизму индукции нейтрализующих антител, понижая количество зараженных клеток и предотвращая заболевание. Эффективные профилактические вакцины позволяют имитировать целевые инфекции и подготавливают приобретённый иммунитет к последующей

встрече с инфекционным агентом. Терапевтические вакцины предназначаются для уничтожения инфицированных клеток. Такие вакцины должны активировать антигенспецифические Т-клеточные эффекторные механизмы, которые используются иммунной системой организма для контроля и ликвидации вирусных инфекций. Эти механизмы включают Т-клеточную цитотоксичность и секрецию цитокинов с прямым или косвенным воздействием на инфицированные клетки – IFN-α и IFN-γ или IL-1 и IL-12 соответственно [5].

Открытие Х. Хаузена, установившего роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки, послужило основанием для профилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний методом вакцинации [6]. Вирусы папилломы человека, включающие свыше 100 различных типов, способны инфицировать гениталии и слизистую ануса и служат основным провоцирующим фактором в развитии аденокарциномы, рака влагалища, рака полового члена [7]. Несмотря на отсутствие летальных случаев, папилломы наносят существенный вред здоровью, снижают качество жизни пациентов, требуют длительного лечения и весьма часто рецидивируют вне зависимости от типа лечения.

СТРОЕНИЕ ВПЧ

Вирусы папилломы человека, ВПЧ (Human Papillomavirus, HPV), – группа вирусов из рода папилломавирусов, рода А семейства паповирусов

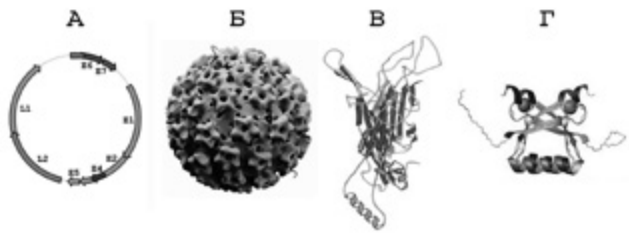


Рисунок 1. А – структура генома ВПЧ, Б – модель структуры капсида ВПЧ, В – модель L1, Г – модель димера E7

(Papovaviridae). Вирусы диаметром 52–55 нм обладают капсидом кубического типа симметрии, состоящим из 72 капсомеров и образующим икосаэдр с триангуляционным числом, равным семи; суперкапсид отсутствует. Сферическая структура сформирована двумя типами пентамеров, образующих соответственно по шесть и по пять связей с соседними пентамерами. Геном вируса, заключённый в кольцевидной замкнутой двух цепочечной ДНК, образован приблизительно 8000 пар оснований, разделенных на шесть ранних, «E» (early), и два поздних, «L» (late), гена (рисунок 1). Классификация папилломавирусов обусловлена различиями в их последовательностях [8].

ВПЧ реплицируются исключительно в многослойном плоском эпителии, используя дифференциацию эпителия для регуляции собственной репликации (рисунок 2). Инфицирование эпителиальных стволовых клеток, расположенных в базальном слое,

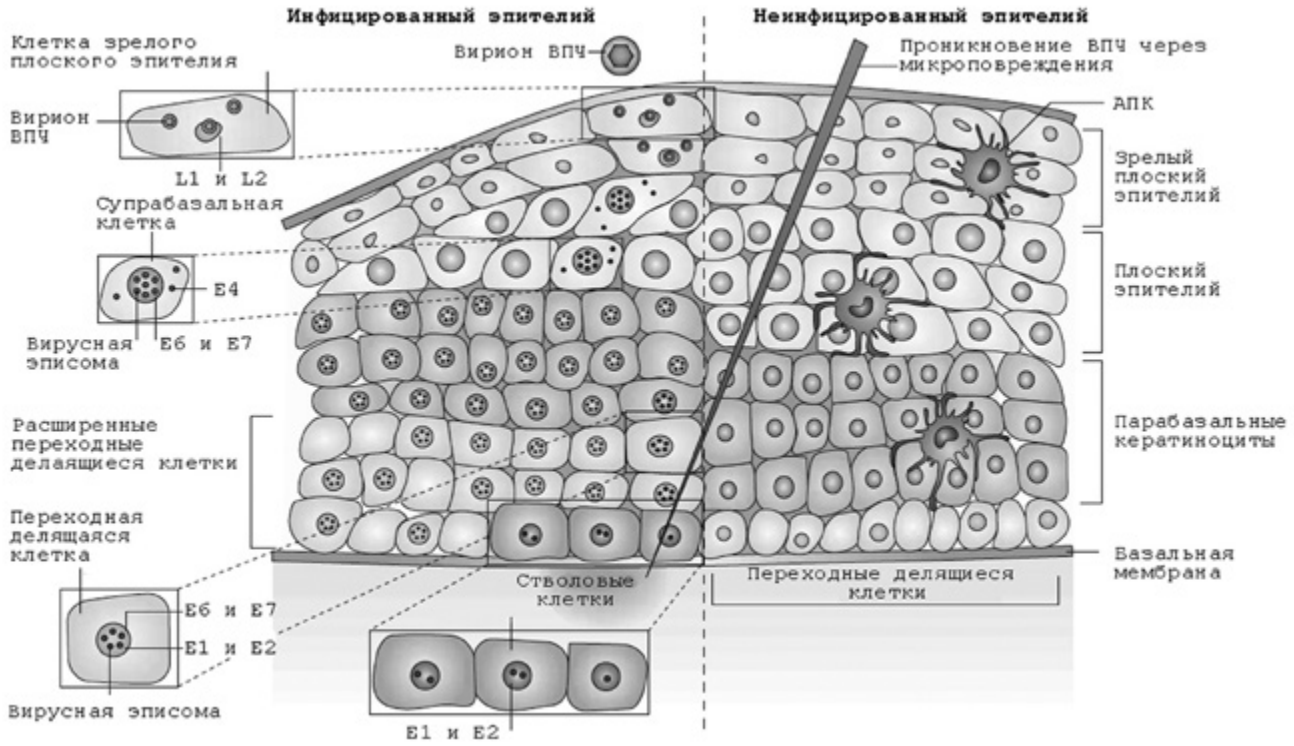


Рисунок 2. Основные этапы жизненного цикла ВПЧ в плоском эпителии [5]

происходит за счёт проникновения вируса через микроповреждения эпителиальных тканей. Репликация вирусной ДНК, протекающая в эпителиальных стволовых клетках и переходных делящихся клетках, требует участия белков E1 и E2. В результате репликации переходные делящиеся клетки заполняют базальный слой эпителия. Последующая экспрессия вирусных белков E6 и E7 задерживает процессы остановки и дифференциации клеточного цикла, препятствуя развитию эпителиальных клеток до фенотипа кератиноцитов. Сбой в остановке клеточного цикла приводит к дальнейшей вирусной репликации в супрабазальных эпителиальных клетках и к утолщению кожи и возникновению бородавок. По мере завершения процессов дифференциации эпителиальных клеток до зрелых кератиноцитов происходит сборка структурных белков L1 и L2. Финальная сборка зрелых вирионов осуществляется в поверхностных слоях эпителиальных клеток.

Инфицирование вирусами папилломы высокого риска может приводить к интеграции вирусной эписомы в ДНК хозяина. Интеграция зачастую сопровождается изменением последовательности вирусного гена E2, отвечающего за подавление транскрипции генов E6 и E7. Как следствие, клетки с избыточной экспрессией E6 и E7 приобретают способность к неконтролируемой пролиферации, приводящей к различного рода дисплазиям [5].

Инфицирование половых органов и анальной области папилломавирусами проявляется в форме кондилом и дисплазий, их злокачественность обусловлена свойствами ранних генов. Идентификация папилломавирусов в организме пациента позволяет установить клинический исход и определить наиболее эффективную терапию. Известно, что папилломавирусы 2 и 27 типов опосредуют появление «простых» бородавок, 6 и 11 типов связаны с незлокачественными папилломами и кондиломами аногенитальной области и гортани, а 16 и 18 типов – с карциномами. Другие типы ВПЧ также могут приводить к инвазивному раку или карциномам [9].

АНТИГЕНЫ НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВПЧ

Белки L1 и L2 отвечают за сборку капсида и упаковку ДНК, при этом L1 является определяющим в образовании пентамеров капсида [10]. Рекомбинантная экспрессия L1 в дрожжевых и вирусных системах позволяет получать вирусоподобные частицы (VLP), состоящие из пентамеров L1, объединённых в структуру, близкую к оригинальному вириону [11]. Аминокислотные последовательности L1 высококонсервативны, так, оценка 49 последовательностей различных типов ВПЧ показала, что отличия в аминокислотных последовательностях L1 составляют приблизительно 10% [12]. Типоспецифичные вариабельные аминокислотные остатки перемежаются с сегментами консервативных остатков. Пространственное моделирование структуры VLP позволило определить, что вариабельные регионы, представленные последовательностями размером 10–30 аминокислотных остатков, находятся на выступающей наружной поверхности VLP и образуют пространственные структуры типа альфа-спираль, при этом консервативные области погружены во внутреннюю часть вириона (рисунок 2). Экспозиция вариабельных регионов на поверхности VLP позволяет предположить, что альфа-спирали L1 являются вероятными кандидатами для взаимодействия с рецепторами клеток. Одним из возможных внеклеточных мембранных белков является интегрин альфа, биосинтезирующийся в разнообразных типах клеток [13].

Распознавание эпитопов при их нейтрализации моноклональными и поликлональными сыворотками позволило определить, что именно плотноупакованная структура поверхности капсомера опосредует его высокую иммуногенность [14]. Типоспецифичность определяется именно составом эпитопов. VLP, сформированные главным капсидным белком L1, индуцируют выработку нейтрализующих антител класса IgG у привитых животных. Иммунизация препаратами VLP позволяет защищать экспериментальных животных от последующего заражения вирусом [15, 16].

Функциональные физиологические характеристики L1 послужили поводом для разработки вакцин на основе VLP. Как было показано выше, подобные препараты не содержат продукты экспрессии ранних генов и не являются инфекционными. Современные вакцины против ВПЧ-ассоциированных заболеваний представлены препаратами Гардасил® и Церварикс®, содержащими в качестве действующих веществ вирусоподобные частицы на основе L1 (таблица 1).

II и III фазы клинических исследований, проведённые в Америке и Европе, показали, что через месяц после третьей вакцинации почти для 100% женщин в возрасте от 15 до 26 лет уровни антител к каждому генотипу ВПЧ были в 10–104 раз выше, чем для контрольной группы, при этом уровни, достигнутые после вакцинации, были обратно пропорциональны возрасту [18, 19]. Выработка антител после введения третьей дозы и через 18 месяцев после вакцинации сокращалась примерно на один порядок, после чего выравнивалась, оставаясь неизменной на протяжении как минимум 5 лет наблюдения [20]. Исследование терапевтической эффективности вакцин в лечении

умеренной дисплазии шейки матки (CIN II) и аденокарциномы шейки матки (AIS) среди женщин, инфицированных ВПЧ 16 и 18 типов, показало отсутствие защитного эффекта. Наблюдаемая эффективность вакцин в отношении CIN II и AIS была намного ниже для инфицированных женщин, чем для женщин без признаков ВПЧ-инфекции в прошлом [21].

Таблица 1.

Зарегистрированные VLP-вакцины ВПЧ [17]

Производитель / торговое наименование	**Квадривалентная вакцина**	**Бивалентная вакцина**
	Merck [Gardasil]	**GlaxoSmithKline [Cervarix]**
Генотипы VLP	6, 11, 16, 18	16, 18
Клеточный субстрат	Дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*)	Клетки насекомых (бакуловирусная экспрессионная система)
Адъювант	Аморфный гидроксифосфат-сульфат алюминия (AAHS)	3-0-дезацил-4`-монофосфориллипид А (MPL), сорбированный на гидроксиде алюминия (AS04)

Зафиксированные данные позволили рекомендовать «Гардасил» и «Церварикс» исключительно для профилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний. Среди недостатков вакцин можно выделить низкую эффективность при вакцинации пациентов среднего и пожилого возрастов, побочные эффекты в форме болевых ощущений в месте инъекции, эритем и отёков, необходимость повторной вакцинации и высокую цену (на уровне 3000–5000 руб.). Вакцины на основе L1 не защищают от всех патогенных типов ВПЧ. Следующее поколение вакцин, содержащих консервативные эпитопы белка L2, обещает предоставить широкую защиту от всех ВПЧ, препятствуя как возникновению рака, так и распространению доброкачественных кожных неоплазий.

Минорный структурный белок L2 присутствует в вирионе ВПЧ в количестве примерно в 30 раз меньшем, чем L1 [22]. Мономеры L2 формируют межмолекулярный комплекс с пентамерами L1, закрепляясь во внутренней части капсида ВПЧ. Считается, что L2 не участвуют в формировании капсида и не взаимодействуют с клеточными рецепторами. Их биохимическая активность опосредует сборку вирусных ДНК [23]; обеспечивает процессы проникновения вируса в клетки хозяина и последующего внутриклеточного транспорта вирусного генома [24]; индуцирует конформационные изменения в поражённых вирусом клетках за счёт нарушения структуры мембран [25].

Несмотря на тот факт, что L2 не участвует в процессах связывания вирионов с клетками, небольшой фрагмент L2 экспонируется на поверхности капсида и является доступным для множества нейтрализующих антител [26]. Известно, что на N-концевой части L2 содержатся высококонсервативные для человеческих и животных штаммов вируса последовательности. Некоторые антитела, специфичные к ряду эпитопов N-концевой части L2, могут перекрестно нейтрализовать широкий спектр человеческих и животных штаммов вируса [27].

Иммунизация кроликов двумя модельными белками, представленными фрагментами эпитопов L2, конъюгированных с белками λ-CII и trpE, приводила к выработке высокого титра антител и препятствовала развитию модельной кожной инфекции [28, 29]. Иммунизация крупного рогатого скота экспериментальной профилактической вакциной на основе L2, слитого с глютатион-S-трансферазой, и алюминиевого адъюванта приводила к выработке нейтрализующих антител и обеспечивала продолжительную устойчивость к инфекции при низких дозах антигена [30]. Терапевтическая вакцина на основе L2 для лечения генитальных бородавок в настоящее время проходит клинические испытания [31].

Имеются данные о выделении двух антител к эпитопам L2 ВПЧ 16 типа, способных нейтрализовать модельную вирусную инфекцию как 16, так и 6 типов ВПЧ. Эти моноклональные антитела распознают фрагменты L2, соответствующие аминокислотным остаткам №108-120; стоит отметить, что эта область гомологична для различных генотипов вируса папилломы [32]. По всей видимости, эти кроссреактивные эпитопы экспонируются на поверхности вириона ВПЧ, что делает возможным их нейтрализацию [30, 32].

Известно, что в развитии ВПЧ-ассоциированных неоплазий участвуют как минимум 15 штаммов ВПЧ высокого риска [33]. Изготовление на основе вирусоподобных частиц, полученных из штаммов различных серотипов, лекарственных препаратов, направленных на полную защиту от инфекции, представляется громоздким и дорогим. По этой причине кросс-реактивные консервативные эпитопы L2, обладающие широкой специфичностью к ВПЧ различных

генотипов, являются перспективными кандидатами для создания эффективных профилактических вакцин против ВПЧ.

АНТИГЕНЫ НА ОСНОВЕ РАННИХ БЕЛКОВ ВИРИОНА ВПЧ

Онкобелки E5, E6 и E7 отвечают за возникновение и поддержание предраковых новообразований и являются приоритетными кандидатами при разработке вакцин терапевтического действия [8]. E6 и E7 играют критическую роль в патогенезе опухолевого роста, приводя к подавлению механизмов иммунного контроля и неконтролируемому клеточному делению [35]. Они способны изменять клеточный цикл за счёт связывания с белками-супрессорами опухолевого роста p53 и pRb. Прочность связывания и степень инактивации белков-супрессоров напрямую влияют на вероятность перевода незлокачественной папилломы в злокачественное новообразование. Трансформационная активность ВПЧ опосредована комбинированным действием E6 и E7, использование отдельного антигена E7 устраняет риски реверсии вирулентности.

При изучении биопсийного материала установлена связь между гиперэкспрессией E7 и уменьшением количества pRb. Основное свойство онкопротеинов E7 заключается в их трансформационной активности, приводящей к изоляции гипофосфорилированных форм pRb [35]. E7 штаммов высокого риска связывают pRb плотнее и фосфорилируются до большей степени, нежели E7 штаммов низкого риска; различия обусловлены их разной аффинностью к pRb для различных штаммов ВПЧ [36].

Аминокислотную последовательность онкопротеинов E7 можно условно разделить на три региона: CR1, CR2 и CR3 (рисунок 2). CR1 и CR2 представлены неструктурированными гибкими последовательностями, готовыми к взаимодействию с pRb без предварительной реструктуризации E7. Аминокислотная последовательность LHCYE, принадлежащая CR2, непосредственно отвечает за связывание с pRb. CR3 способен автономно сворачиваться в высокоструктурированный цинксвязывающий домен, опосредующий димеризацию E7 [37]. В многочисленных исследованиях было показано, что E7 демонстрирует АТФ-зависимую шаперонную активность на ряде модельных белков, что может объяснить его широкую специфичность к различным мишеням, в том числе pRb [38].

Экспериментальные терапевтические вакцины на основе E7 показали эффективность на животных моделях, часть из них находится на II и III фазах клинических исследований [5, 39]. Показано, что основные недостатки антигенов E7 связаны с их слабой презентацией иммунокомпетентным клеткам, что отражается на низких уровнях выработки эффекторных популяций Т-клеток и плохом распространении этих популяций в невоспаленные участки организма. Таким образом, при разработке эффективной вакцины на основе E7 решающее значение имеет выбор адъюванта [40].

Одним из наиболее интересных решений по увеличению иммуногенности E7 является их рекомбинантная гибридизация с высокомолекулярными белками теплового шока (БТШ). БТШ усиленно вырабатываются под воздействием стрессовых условий, предотвращая агрегацию и участвуя в сборке неверно свёрнутых белков. Они отвечают за транспорт белков вдоль мембранных органелл, стабилизацию свежесинтезированных или несвёрнутых полипептидов и контролируют биологическую активность белков-субстратов посредством регуляции фолдинга, что позволяет классифицировать их как белки-шапероны [41].

Основной интерес к высокомолекулярным БТШ связан с их влиянием на иммунокомпетентные клетки, что позволяет рассматривать их использование при создании вакцин. Считается, что при стрессовых ситуациях и при повреждениях тканей БТШ выходят из клеток, выступая в качестве модуляторов иммунного ответа [42]. Исследования биопсийного материала показали, что половина изученных опухолей имели на наружной мембране БТШ70, при исследовании здоровых тканей аналогичного происхождения белок не был обнаружен [43].

В многочисленных исследованиях показано, что БТШ70 способен стимулировать выработку естественных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов и участвовать в их транспорте к опухолевым клеткам [44]. Известно, что БТШ70 может принимать участие в презентации антигенов совместно с белками главного комплекса гистосовместимости, при этом формирование комплекса с антигеном предотвращает протеалитический гидролиз антигена и позволяет депонировать достаточное количество антигена для презентации [45]. Введение белка мышам с привитой опухолью приводило к увеличению продолжительности их жизни и уменьшению опухолей [46].

Ещё одной описанной иммуномодулирующей функцией БТШ70 является его способность стимулировать выработку фактора некроза опухолей, интерлейкинов, макрофагов и лимфоцитов, что приводит к активации системы врождённого иммунитета [47]. Предполагается, что ковалентная конъюгация E7 с БТШ70 позволит увеличить иммуногенность E7 [48].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение структуры и свойств функциональных элементов вириона ВПЧ позволяет моделировать вакцины с предсказуемой профилактической и терапевтической эффективностью. Основными недостатками таких вакцин являются слабая презентация антигена и пониженный транспорт в невоспаленные участки организма. При разработке эффективной вакцины определяющим моментом является правильный выбор адъюванта, способного участвовать в процессах презентации и обладающего ярко выраженными иммуногенными свойствами. Комплексные адъюванты на основе неорганических солей алюминия и высокомолекулярные белки теплового шока могут стать перспективными кандидатами для повышения иммуногенности вакцин для лечения ВПЧ-ассоциированных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Ройт. Иммунология. – М.: Мир, 2000. С. 15.
2. Н.В. Медуницын. Вакцинология. – М.: Триада-Х, 2004. Ч. 1.
3. R.T. Kenney, R. Edelman, M.M. Levine, J.B. Kaper, R. Rappuoli. In New Generation Vaccines. 2nd ed. – N.Y.; Basel: Marcel Dekker, 1997. P. 213–223.
4. M. Liniger, A. Zuniga, H.Y. Naim. Use of viral vectors for the development of vaccines // Expert Rev. Vaccines. 2007. V. 6. № 2. P. 255–266.
5. I.H. Frazer. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination // Nature Rev. Immunol. 2004. V. 4. P. 46–54.
6. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2008. URL: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/ (дата обращения 23.01.2016).
7. V. Cogliano, R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan. Carcinogenicity of human papillomaviruses // Lancet Oncol. 2005. V. 6. P. 204.
8. F. Fehrmann, L.A. Laimins. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation // Oncogene. 2003. V. 22. № 33. P. 5201–5207.
9. В.А. Исаков, Д. К. Ермоленко, Ф. Р. Кутуева. Использование циклоферона в терапии папилломавирусной инфекции. Рекомендации для врачей. – СПб.; Великий Новгород: Тактик-Студио, 2007. С. 64.
10. X.S. Chen, G. Casini, S.C. Harrison, R.L. Garcea. Papillomavirus capsid protein expression in Escherichia coli: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1 // J. Mol. Biol. 2001. V. 307. № 1. P. 173–182.
11. J. Zhou, X.Y. Sun, D.J. Stenzel, I.H. Frazer. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles // Virology. 1991. V. 185. P. 251–257.
12. X.S. Chen, R.L. Garcea, I. Goldberg, G. Casini, S.C. Harrison. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16 // Mol. Cell. 2000. V. 5. № 3. P. 557–567.
13. R.B. Roden, R. Kirnbauer, A.B. Jenson, D.R. Lowy, J.T. Schiller. Interaction of papillomaviruses with the cell surface // J. Virol. 1994. V. 68. № 11. P. 7260–7266.
14. V.A. Olcese, Y. Chen, R. Schlegel, H. Yuan. Characterization of HPV16 L1 loop domains in the formation of a type-specific, conformational epitope // Microbiol. 2004. V. 4. P. 29.
15. J.A. Suzich, S.J. Ghim, F.J. Palmer-Hill, W.I. White, J.K. Tamura. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas // Proc. Natl. Acad. Sci. 1995. V. 92. № 25. P. 11553–11557.
16. F. Breitburd, R. Kirnbauer, N.L. Hubbert, B. Nonnenmacher, G. Trin-Dinh-Desmarquet. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection // J. Virol. 1995. V. 69. № 6. P. 3959–3963.
17. F.T. Cutts, S. Franceschi, S. Goldie, X. Castellsague, S. de Sanjose. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review // Bull. World Health Organ. 2007. V. 85. № 9. P. 719–726.
18. L.L. Villa, K.A. Ault, A.R. Giuliano, R.L. Costa, C.A. Petta. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18 // Vaccine. 2006. V. 7. № 27–28. P. 5571–5583.
19. D.M. Harper, E.L. Franco, C.M. Wheeler, A.B. Moscicki, B. Romanowski. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial // Lancet. 2006. V. 367. № 9518. P. 1247–1255.
20. L.L. Villa, R.L.R. Costa, C.A. Petta, R.P. Andrade, J. Paavonen. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up // Br. J. Cancer. 2006. V. 95. № 11. P. 1459–1466.
21. Vaccines And Related Biological Products Advisory Committee Meeting. URL: http://www.fda.gov/

ohrms/dockets/ac/06/briefing/2006-4222b-index.htm (дата обращения 23.01.2016).

22. R. Kirnbauer, J. Taub, H. Greenstone, R. Roden, M. Dürst. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles // J. Virol. 1993. V. 67. № 12. P. 6929–6936.
23. S.C. Holmgren, N.A. Patterson, M.A. Ozbun, P.F. Lambert. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle // J. Virol. 2005. V. 79. № 7. P. 3938–3948.
24. M.E. Hagensee, N. Yaegashi, D.A. Galloway. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins // J. Virol. 1993. V. 67. № 1. P. 315–322.
25. N. Kämper, P.M. Day, T. Nowak, H.C. Selinka, L. Florin. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes // J. Virol. 2006. V. 80. № 2. P. 759–768.
26. J.M. Gaukroger, L.M. Chandrachud, B.W. O'Neil, G.J. Grindlay, G. Knowles, M.S. Campo. Vaccination of cattle with bovine papillomavirus type 4 L2 elicits the production of virus-neutralizing antibodies // J. Gen. Virol. 1996. V. 77. № 7. P. 1577–1583.
27. M.E. Embers, L.R. Budgeon, T.D. Culp, C.A. Reed, M.D. Pickel, N.D. Christensen. Differential antibody responses to a distinct region of human papillomavirus minor capsid proteins // Vaccine. 2004. V. 22. № 5–6. P. 670–680.
28. N.D. Christensen, J.W. Kreider, N.C. Kan, S.L. DiAngelo. The open reading frame L2 of cottontail rabbit papillomavirus contains antibody-inducing neutralizing epitopes // Virology. 1991. V. 181. № 2. P. 572–579.
29. Y.L. Lin, L.A. Borenstein, R. Selvakumar, R. Ahmed, F.O. Wettstein. Effective vaccination against papilloma development by immunization with L1 or L2 structural protein of cottontail rabbit papillomavirus // Virology. 1992. V. 187. № 2. P. 612–619.
30. L.M. Chandrachud, G.J. Grindlay, G.M. McGarvie, B.W. O'Neil, E.R. Wagner. Vaccination of cattle with the N-terminus of L2 is necessary and sufficient for preventing infection by bovine papillomavirus-4 // Virology. 1995. V. 211. № 1. P. 204–208.
31. C.J. Lacey, H.S. Thompson, E.F. Monteiro, T. O'Neill, M.L. Davies. Phase IIa safety and immunogenicity of a therapeutic vaccine, TA-GW, in persons with genital warts // J. Infect. Dis. 1999. V. 179. № 3. P. 612–618.
32. K. Kawana, H. Yoshikawa, Y. Taketani, K. Yoshiike, T. Kanda. Common Neutralization Epitope in Minor Capsid Protein L2 of Human Papillomavirus Types 16 and 6 // J. Virol. 1999. V. 73. № 7. P. 6188–6190.
33. Human Papillomaviruses. URL: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90.pdf (дата обращения 23.01.2016).
34. M. Rolfe, P. Beer-Romero, S. Glass, J. Eckstein, I. Berdo. Reconstitution of p53-ubiquitinylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. № 8. P. 3264–3268.
35. K. Münger, B.A. Werness, № Dyson, W.C. Phelps, E. Harlow, P.M. Howley. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product // EMBO J. 1989. V. 8. № 13. P. 4099–4105.
36. K. Münger, W.C. Phelps, V. Bubb, P.M. Howley, R. Schlegel. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes // J. Virol. 1989. V. 63. № 10. P. 4417–4421.
37. O. Ohlenschläger, T. Seiboth, H. Zengerling, L. Briese, A. Marchanka, R. Ramachandran. Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7 // Oncogene. 2006. V. 25. № 44. P. 5953–5959.
38. K. Münger, J.R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S.L. Gonzalez. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein // Oncogene. 2001. V. 20. № 54. P. 7888–7898.

АНАЛИТИКА
ЭКСПО

14-я Международная выставка
ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ И ХИМИЧЕСКИХ РЕАКТИВОВ

12–14 апреля 2016 года
МОСКВА, КВЦ «СОКОЛЬНИКИ»



ЗАБРОНИРУЙТЕ СТЕНД НА САЙТЕ
www.analitikaexpo.com

Организатор
Группа компаний ITE
Тел: +7 495 935 81 00
E-mail: analitikaexpo@ite-expo.ru

Генеральный инфо-партнер:
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

УДК 615.12

1 – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, 143442, Россия, Московская обл., Красногорский район, п/о Отрадное, пос. Светлые горы, владение 1

2 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8

1 – FSBIS SCBMT FMBA, 1, pos. Svetlye gory, p/o Otradnoe, Krasnogorskiy r-n, Moscow region, 143442, Russia

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

*** адресат для переписки:**
E-mail: lvovaanna1@yandex.ru

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА ДЛЯ ТЕСТА КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

А.А. Львова[1]*, И.Е. Шохин[1], Л.А. Меньшикова[1], Т.Н. Комаров[1], Ю.Е. Болдина[1], Ю.В. Медведев[2]

Резюме. Проведена валидация методики количественного определения левофлоксацина для теста кинетики растворения его таблеток. Количественное определение проводили методом УФ-спектрофотометрии. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитический диапазон. По результатам исследования основные валидационные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости, приведенным в ОФС «Валидация аналитических методик».

Ключевые слова: валидация, левофлоксацин, УФ-спектрофотометрия, тест кинетики растворения.

VALIDATION OF UV-SPECTROMETRY ASSAY METHOD FOR DISSOLUTION PROFILE TEST FOR LEVOFLOXACINE TABLETS

A.A. Lvova[1]*, I.E. Shohin[1], L.A. Menshikova[1], T.N. Komarov[1], Yu.E. Boldina[1], Yu.V. Medvedev[2]

Abstract. Validation of UV-spectrometry assay method for dissolution profile test for levofloxacine tablets was carried out. The evaluated validation characteristics were: specificity, linearity, accuracy, precision, analytical range. It was shown than main validation characteristics meet the Russian State Pharmacopoeia requirements.

Keywords: validation, levofloxacin, UV-spectrophotometry, dissolution profile test.

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшее значение для разработки и анализа лекарственных средств (ЛС) в твердых дозированных лекарственных формах имеет испытание «Растворение» (ОФС 42-0003-04) [1], при помощи которого можно осуществлять выбор оптимального состава лекарственной формы, оценивать поведение действующего вещества при проведении сравнительных исследований *in vitro*, контролировать изменения в процессе производства, определять качество готового препарата [2].

Как и любой другой аналитический метод, методики теста «Растворение» должны быть подвергнуты валидации. Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика обеспечивает получение необходимой и достоверной информации об объекте анализа и пригодна для практического использования [3].

Критерии приемлемости основных валидационных характеристик теста «Растворение» различаются в разных нормативных документах (USP, ICH, АРФП), при этом лабораториям рекомендуется разработать собственную стандартную операционную процедуру по валидации теста «Растворение» на основании указанных документов [1, 4–6]. Валидацию проводят как для собственно теста «Растворение», так и для аналитической методики количественного определения [7]. При этом для теста кинетики растворения по сравнению с показателем «Растворение» рекомендуется валидировать более широкий аналитический диапазон, а также учитывать необходимость проведения исследования в нескольких (обычно с pH 1,2, 4,5, 6,8) средах растворения [7].

Целью данного исследования являлось проведение валидации методики количественного определения левофлоксацина при выполнении теста кинетики растворения. Количественное определение проводили методом УФ-спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Таваник®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг («Санофи Винтроп Индустрия», Франция), вспомогательные вещества: натрия стеарилфумарат, гипро-

меллоза, кросповидон; пленочная оболочка: гипромеллоза, макрогол 8000, тальк, титана диоксид, железа оксид красный, железа оксид желтый.

Как и другие фторхинолоны, обладает широким спектром антибактериального действия. Превосходит другие хинолоны по активности в отношении пневмококков, микоплазм и хламидий. Эффективен в отношении микроорганизмов, устойчивых к большинству антибиотиков и сульфаниламидам. Оказывает бактерицидное действие. Применяют преимущественно при инфекциях дыхательных путей [8].

В качестве действующего вещества исследуемое лекарственное средство содержит левофлоксацин: (-)-(S)-9-фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-*7H*-пиридо[1,2,3-де]-[1,4]-бензоксазин-6-карбоновой кислоты гемигидрат.

Структурная формула представлена на рисунке 1.

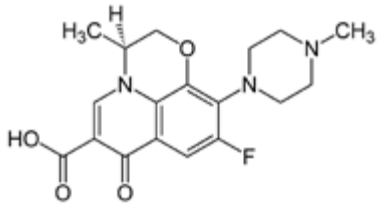


Рисунок 1. Структурная формула левофлоксацина

Согласно опубликованным данным левофлоксацин относится к 1 классу БКС [9, 10].

Оборудование

- УФ-спектрофотометр Agilent Technologies Cary 8454 UV-Vis, США.



Agilent Technologies Cary 8454 UV-Vis

Пробоподготовка

Приготовление сред растворения.

0,1 М раствор хлористоводородной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 500 мл воды очищенной, 8,7 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводили объем раствора до 1000 мл водой очищенной и тщательно перемешивали.

0,2 М раствор уксусной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 200 мл воды очищенной, прибавляли 11,6 мл уксусной кислоты ледяной, давали раствору охладиться до комнатной температуры, доводили объем раствора до метки водой очищенной и тщательно перемешивали.

Ацетатный буферный раствор pH 4,5

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 2,99 г натрия ацетата тригидрата и растворяли в 200 мл воды очищенной. К полученному раствору прибавляли 14 мл 0,2 М раствора уксусной кислоты, доводили объем раствора до метки водой очищенной и тщательно перемешивали. Измеряли pH раствора на pH-метре, при необходимости доводили pH до 4,5 0,2 М раствором уксусной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Фосфатный буферный раствор pH 6,8

4,67 г натрия гидрофосфата и 4,609 г калия дигидрофосфата вносили в мерный стакан вместимостью 1000 мл, прибавляли 400 мл воды очищенной, перемешивали с использованием магнитной мешалки в течение приблизительно 30 мин до полного растворения, затем переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводили объем раствора до метки водой очищенной и тщательно перемешивали.

Измеряли pH раствора на pH-метре, при необходимости доводили pH до 6,8 раствором фосфорной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Приготовление стандартных растворов

Для приготовления исходного стандартного раствора левофлоксацина 51,0 мг субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты. Содержимое колбы перемешивали до полного растворения навески, объем раствора доводили до метки соответствующей средой растворения и перемешивали. Концентрация приготовленного раствора приблизительно равна 0,5 мг/мл (раствор А). 5,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 200 мл, объем раствора доводили до метки соответствующей средой растворения, перемешивали. Концентрация приготовленного раствора приблизительно равна 0,0125 мг/мл (раствор Б).

Стандартные растворы готовили путем разведения растворов А и Б средой растворения (таблица 1).

Количественное определение проводили методом УФ-спектрофотометрии. Измеряли оптическую плотность стандартных растворов на спектрофотометре в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм в области максимального поглощения при длине волны

294 нм, используя в качестве раствора сравнения среду для растворения.

Таблица 1.

Приготовление стандартных растворов левофлоксацина

Концентрация приготовленного раствора левофлоксацина, мг/мл	Количество компонента, мл	
	Стандартный раствор левофлоксацина	Среда растворения
0,00125	2,5 (Б)	до 25
0,00375	3 (Б)	до 10
0,00625	10 (Б)	до 20
0,00875	14 (Б)	до 20
0,01125	9 (Б)	до 10
0,01375	5,5 (А)	до 200
0,01625	6,5 (А)	до 200

Программное обеспечение

- Agilent UV-Visible ChemStation, ver. B.05.02 [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики

Валидацию методики проводили согласно ГФ XII, том 2, ОФС «Валидация аналитических методик» по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (на двух уровнях: сходимость, промежуточная прецизионность), аналитический диапазон.

Специфичность

Для определения специфичности методики на спектрофотометре последовательно снимали спектры:

– бланка (среда растворения – 0,1М HCl; ацетатный буферный раствор pH 4,5; фосфатный буферный раствор pH 6,8);

– плацебо-раствора (смесь компонентов исследуемого ЛС, не содержащих левофлоксацина);

– стандартного раствора левофлоксацина с концентрацией действующего вещества 100% в приведенных средах растворения.

Определение специфичности проводили в данных средах растворения, т.к. тест «Растворение», согласно «Руководству по экспертизе лекарственных средств», т. 1 [11], проводили в трех средах, моделирующих основные разделы ЖКТ, в которых происходит распадение, высвобождение и абсорбция активного ингредиента (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты; ацетатный буферный раствор 4,5; фосфатный буферный раствор 6,8).

На полученных спектрах бланков и плацебо не наблюдалось пиков, соответствующих пику левофлоксацина в стандартном растворе с концентрацией действующего вещества 100%. Пример полученных спектров стандартного раствора левофлоксацина и среды растворения приведен ниже на рисунке 2.

Линейность

Проводили измерение оптической плотности 7 образцов стандартных растворов левофлоксацина с концентрациями: 0,00125 мг/мл, 0,00375мг/мл, 0,00625мг/мл, 0,00875мг/мл, 0,01125мг/мл, 0,01375мг/мл, 0,01625мг/мл. Для построения калибровочных кривых использовали линейную регрессию с нормированием 1/x. Коэффициент корреляции составил 0,9997.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в таблице 2.

Правильность и прецизионность

Проводили анализ 3 образцов стандартных растворов левофлоксацина с концентрацией 0,00125 мг/мл, 0,00875 мг/мл, 0,01625 мг/мл. Каждый раствор измеряли на спектрофотометре 5 раз. Исследование проводили в двух последовательностях, с участием двух разных аналитиков. Для полу-

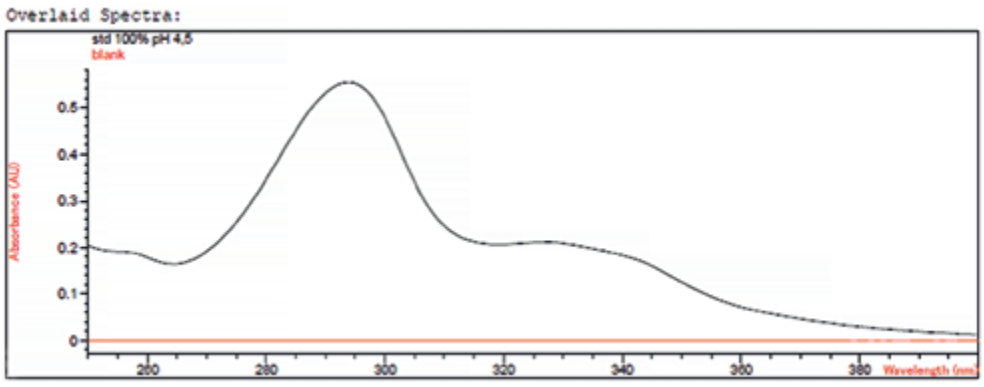


Рисунок 2. Спектры стандартного раствора левофлоксацина с концентрацией действующего вещества 100% и среды растворения ацетатного буферного раствора с pH 4,5

Таблица 2.

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений

Код пробы	Std 10%	Std 30%	Std 50%	Std 70%	Std 90%	Std 110%	Std 130%
$C_{факт}$, мг/мл	0,00125	0,00375	0,00625	0,00875	0,01125	0,01375	0,01625
$C_{рассчит}$, мг/мл	0,00126	0,00378	0,00618	0,00879	0,001114	0,01392	0,01618
ε, %	–0,9341	–0,7544	1,1441	–0,4003	1,0177	–1,2636	0,4372
Норма	Не более 2,00%						

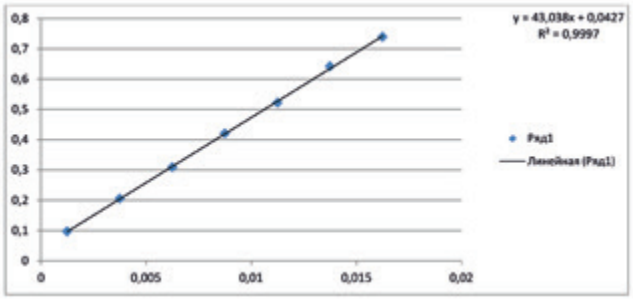


Рисунок 3. Калибровочный график зависимости оптической плотности левофлоксацина от концентрации в растворе

ченных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %), приведенные в таблицах 3 и 4.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) соответствуют нормам (не более 2,00%).

Аналитический диапазон

Интервал между верхним и нижним значением концентрации анализируемого компонента в пробе, в рамках которого доказана приемлемая правильность, прецизионность и линейность методики, – 0,00125 мг/мл и 0,01625 мг/мл (10% и 130% соответственно).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена валидация методики количественного определения левофлоксацина методом УФ-спектрофотометрии. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитический диапазон. По результатам исследования основные валидационные характеристики соответствуют критериям приемлемости. Методика обладает достаточной точностью и селективностью для проведения теста «Растворение» методом УФ-спектрофотометрии.

Таблица 3.

Правильность и прецизионность (сходимость) методики

Введено (мг/мл)	Найдено (мг/мл)	Найдено (мг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, % (n=5)
0,00125	0,00126	0,001243	0,00001039	0,83591	0,5530
	0,00124				
	0,00124				
	0,00124				
	0,00124				
0,00875	0,00868	0,008660	0,00007893	0,91145	1,0251
	0,00865				
	0,00861				
	0,00858				
	0,00879				
0,01625	0,01625	0,016190	0,00005121	0,31634	0,3714
	0,01623				
	0,01619				
	0,01615				
	0,01613				

Таблица 4.

Правильность и прецизионность (промежуточная прецизионность) методики

Введено (мг/мл)	Найдено (мг/мл)	Найдено (мг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD,% (n=5)	ε, % (n=5)
0,00125	0,00126	0,001259	0,000006258	0,4971	-0,7110
	0,00125				
	0,00125				
	0,00126				
	0,00126				
	0,00126				
0,00875	0,00872	0,008655	0,00005157	0,5959	1,0905
	0,00866				
	0,00863				
	0,00858				
	0,00868				
	0,00872				
0,01625	0,01602	0,01608	0,00005445	0,3385	1,0280
	0,01615				
	0,01612				
	0,01608				
	0,01604				
	0,01602				

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный стандарт качества лекарственного средства. ОФС 42-0003-04 «Растворение». – М. 2004.
2. Методические рекомендации для разработчиков и производителей лекарственных средств по изучению сравнительной кинетики растворения твердых дозированных лекарственных форм (Утверждены Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития). – М.: Ремедиум, 2010.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. Т. 2. – М. 2007.
4. И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, К.С. Давыдова. Современные подходы к валидации методик испытания «Растворение» // Химико-фармацевтический журнал. 2011. Т. 45. № 3. С. 92–95.
5. К.С. Давыдова, Ю.И. Кулинич, И.Е. Шохин. Тест «Растворение» в контроле качества лекарственных средств // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2010. № 5. С. 42–43.
6. USP 33 – NF 28. Monograph 1092 «The Dissolution Procedure: Development and Validation».
7. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. Шохина И.Е. – М.: Перо, 2015. 264 с.
8. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. 16-е изд. – М.: Новая волна, 1216 с.
9. M. Koeppe, R. Cristofoletti, E. Fernandes, S. Storpirtis, H. Junginger, S. Kopp, K. Midha, V. Shah, S. Stavchansky, J. Dressman, D. Barends. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: levofloxacin. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21374601 (дата обращения 20.07.2015).
10. General notes on Biopharmaceutics Classification System (BCS)-based biowaiver applications. URL: http://apps.who.int/prequal/info_applicants/BE/BW_general_2011November.pdf (дата обращения 20.07.2015).
11. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. – М.: Гриф и К., 2013. 328 с.

Agilent Technologies

ГХ-МСД Agilent 5977B

ИСТОЧНИК НОВЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ

Увеличение чувствительности в 10 раз

Инструментальный предел обнаружения (IDL) – 1.5 фг благодаря новому источнику ионизации

Уменьшение необходимого объема пробы в 10 раз

Экологичный безмасляный (сухой) вакуумный насос IDP-3

Интеллектуальная технология оптимизирует совместную работу ГХ и МС

Средства интегрированного программного обеспечения упрощают разработку методов



+7 (495) 252–00–98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
8 800 333–42–24
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
www.phct.ru
info@phct.ru
Pharmcontract group of companies
Agilent Technologies
Authorised Distributor

УДК 615.07

1 – Автономное объединение «ШТАДА Фармдевелопмент» АО «НИЖФАРМ», 109029, Россия, г. Москва, Автомобильный проезд, 6

1 – Autonomous Incorporation «STADAPharmdevelopment», JSC «NIZHPHARM», 6, Avtomobilny proyezd, Moscow, 109029, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: naumepshtein@gmail.com
Тел.: 8 (985) 771 73 59

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ ПРЕЦИЗИОННОСТИ (ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ) ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК В ФАРМАЦИИ

Н.А. Эпштейн[1]*

Резюме. Рассмотрены достоинства и недостатки шести способов оценки внутрилабораторной прецизионности (IP) для валидации аналитических методик. Установлено что только четыре из них могут быть рекомендованы для оценки IP, причем три – с ограничениями. Даны рекомендации по использованию рассмотренных способов оценки IP. Показано, что использование наиболее широко применяемого способа оценки IP – по относительному стандартному отклонению совокупности результатов химиков – может приводить к получению ошибочного вывода о внутрилабораторной прецизионности методики. Предложен новый (наиболее универсальный) способ оценки внутрилабораторной прецизионности, который имеет хорошую перспективу применения в фармации.

Ключевые слова: валидация, внутрилабораторная прецизионность, внутрилабораторная воспроизводимость, промежуточная прецизионность.

INTERMEDIATE PRECISION DETERMINATION AT VALIDATION OF METHODS IN PHARMACY

N.A. Epshtein[1]*

Abstract. Merits and demerits of six ways of an assessment of an intermediate precision (IP) for validation of analytical methods are considered. It is established that only four of them can be recommended for IP assessment, and three – with restrictions Recommendations about use of the considered ways of an assessment of IP are made. It is shown that use of the most widely applied way of an assessment of intermediate precision – on a relative standard deviation of set of results of chemists, can lead to receiving a wrong conclusion about an IP of a method. It is offered the new (most universal) way of an assessment of an intermediate precision, that has perspective of application in pharmacy.

Keywords: validation, intermediate precision, intra-laboratory precision, within-laboratory precision, within-laboratory reproducibility, ruggedness.

ВВЕДЕНИЕ

Внутрилабораторная прецизионность (воспроизводимость) является одной из основных характеристик, определение которых требуется при валидации аналитических методик в фармации [1]. К настоящему времени предложено несколько способов ее оценки без критического рассмотрения их применимости. Это может привести к неправильным выводам о внутрилабораторной прецизионности методик.

Цель статьи: 1) рассмотрение способов оценки внутрилабораторной прецизионности методик, их ограничений и преимуществ; 2) предложение нового, универсального способа оценки внутрилабораторной прецизионности для методик, связанных с нормируемой верхней или верхней и нижней границами содержания определяемого вещества.

Отметим, что в литературе имеется несколько альтернативных названий валидационной характеристики intermediate precision ICH [1] как на английском, так и на русском языках.

- В русскоязычной литературе валидационная характеристика intermediate precision сначала переводилась как «*внутрилабораторная воспроизводимость*» [2, 3]. В литературе, не связанной с фармацией, и прежде всего в ГОСТах, стали использовать дословный перевод: «*промежуточная прецизионность*» [4–6]. Однако в фармации этот термин не получил распространения. Напротив, *наиболее часто используют термин «внутрилабораторная прецизионность»* [7–13], *что более логично по смыслу, так как речь идет об оценке, связанной с результатами анализов внутри одной лаборатории.* Заметим также, что в фармации внутрилабораторную прецизионность определяют в условиях варьирования только трех факторов (различные химики, различные дни, различные приборы) [14, раздел <1225>], поэтому ее можно рассматривать как частный случай промежуточной прецизионности [11]. В согласии с этим в ГФ XIII в разделе 1.1.12 «Валидация аналитических методик» говорится о промежу-

точной (внутрилабораторной) прецизионности аналитических методик.

- В англоязычной литературе аналогами термина «*intermediate precision*» *(ICH)* являются «*intra-laboratory precision*», «*within-laboratory precision*», «*within-laboratory reproducibility*», а также «*ruggedness*» *(no USP)* [14 – 31].

Для того чтобы понять требования к внутрилабораторной прецизионности, рассмотрим основные определения вышеупомянутой валидационной характристики.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНУТРИЛАБЛОРАТОРНОЙ ПРЕЦИЗИОННОСТИ ГАРМОНИЗИРОВАННОЕ ПО ICH

«Внутрилабораторная прецизионность устанавливает влияние случайных факторов на прецизионность валидируемой аналитической методики. Типичными исследуемыми факторами являются различные дни, различные аналитики, различное оборудование и т.п. Не считается необходимым изучать влияние каждого фактора отдельно. При изучении влияния различных факторов предпочтительно использовать планирование эксперимента» [1, 10].

United States Pharmacopoeia [14]. Раздел <1225> *Validation of compendia procedures. «Внутрилабораторная прецизионность (intermediate precision; также известная как надежность – ruggedness) выражает внутрилабораторную вариабельность при проведении испытаний в разные дни или разными аналитиками, или на разном оборудовании в одной лаборатории…* Документы ICH рекомендуют оценивать повторяемость с использованием минимум девяти определений, охватывающих всю аналитическую область методики (т.е. три концентрации и три повторения для каждой концентрации), или с использованием шести определений при 100% испытуемой концентрации».

Раздел <1092> Dissolution Procedure: Development and Validation. «Для многих аналитических процедур внутрилабораторная прецизионность, как правило, оценивается путем определения вкладов в дисперсию и, возможно, путем сравнения средних (значений)». Следует обратить внимание на то, что в этом, значительно обновленном разделе, допускается необходимость сравнения средних результатов анализа. По видимому, допущение возможности, а не рекомендация необходимости сравнения средних результатов анализа при оценке внутрилабораторной прецизионности связано с тем, что в основном разделе <1225> пока нет рекомендации сравнивать средние значения. Однако *логически понятно, что только на основании стандартных отклонений или относительных стандартных отклонений, без сравнения средних результатов анализа разных химиков нельзя получить надежную оценку внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) методики.* В пользу этого свидетельствует рекомендация в разделе <1092>, посвященном внутрилабораторной прецизионности, в качестве критерия использовать различие между средними значениями растворения: «различие в средних значениях результатов растворения между любыми двумя условиями, при использовании одной и той же дозировки, не должно превышать абсолютных 10% во временных точках <85% растворения и абсолютных 5% для временных точек >85%» [14].

Перейдем к рассмотрению способов внутрилабораторной прецизионности методик, учитывая вышесказанное.

Способ 1. Оценка внутрилабораторной прецизионности по относительному стандартному отклонению совокупности результатов двух химиков RSD_T

Для методик определения содержания основных веществ определяют стандартные отклонения результатов анализа каждого из химиков, проверяют, что экспериментальные значения $RSD_i \leq 2{,}0\%$. Затем проверяют, что для совокупности результатов обоих химиков значение $RSD_T \leq 2{,}0\%$ (индекс T от слова total – «общий», «совокупный»). *Хотя этот способ пока еще является наиболее распространенным, он имеет существенный недостаток: не учитывается различие между средними результатами, полученными химиками. А это может приводить к ошибочному заключению о приемлемости внутрилабораторной прецизионности методики* (это показано при рассмотрении способа 6).

Очевиден вопрос: почему в качестве критерия взято именно значение $RSD_T \leq 2{,}0\%$, а не другое. Ответ, по-видимому, заключается в том, что в качестве критического значения RSD_T взято наименьшее из возможных приемлемых значений RSD по ставшей классической эмпирической формуле Горвица (Horwitz) для C=1, где C – массовая доля аналита в веществе. Отметим, что для примесей (то есть для низких концентраций определяемых веществ: C<<1) для оценки приемлемости сходимости и воспроизводимости (внутрилабораторной прецизионности) в литературе приведены значительно более высокие пороговые значения RSD (таблица 1) в зависимости от предела количественного определения LQ [3 (C. 51), 19].

Таблица 1.

Допустимые значения прецизионности (RSD_{max}) для методик определения примесей в зависимости от предела количественного определения QL [3 (C. 51), 19]

Диапазон концентраций	RSD_{max}	
	Повторяемость (сходимость)	Воспроизводимость
От QL до <2 QL	25,0%	30,0%
От 2 QL до <10 QL	15,0%	20,0%
От 10 QL до <20 QL	10,0%	15,0%
≥20 QL	5,0 %	10,0%

Способ 2. Оценка внутрилабораторной прецизионности по формуле Горвица или по связанному с ней коэффициенту Хорратa

Горвиц (Horwitz) с соавторами проанализировал несколько тысяч результатов межлабораторного тестирования аналитических методик в широком интервале концентраций. Он пришел к выводу, что существует взаимосвязь между концентрацией определяемого вещества, выраженной в массовых долях, и межлабораторным стандартным отклонением (reproducibility standard deviation), независимая от аналита, вспомогательных веществ и методики анализа [32, 33]. В результате была предложена формула зависимости средних значений относительного стандартного отклонения RSD_R от массовой доли определяемого компонента в анализируемом веществе (C) – формула Горвица:

$$RSD_r = 2^{(1-0,5\log C)}, \quad (1)$$

где индекс R означает «reproducibility»; заметим, что в формулах коэффициентов Хорратa (ниже) используется символ $PRSD_R$, соответствующий RSD_R в формуле Горвица. Было предложено рассматривать как приемлемые результаты оценки межлабораторной воспроизводимости методик, если экспериментально полученные значения RSD попадают в доверительный интервал от $0,5 \times RSD_R$ до $2 \times RSD_R$. Позднее появилась уточняющая рекомендация: «*При оценке эффективности работы лабораторий* значения вариабельности, в полтора-два раза превышающие прогнозируемые значения, рассчитанные с помощью уравнения на основании концентрации, считаются приемлемыми. *Предполагаемая внутрилаблораторная вариабельность, как правило, составляет половину или две трети межлабораторной вариабельности*» [3, 30] (рисунок 1). Последняя оценка соответствует требованию для приемлемости внутрилабораторной прецизионности: совокупное стандартное отклонение результатов анализа химиков $RSD_T < 0,67 \times RSD_R$ (рисунок 1, область под кривой 3).

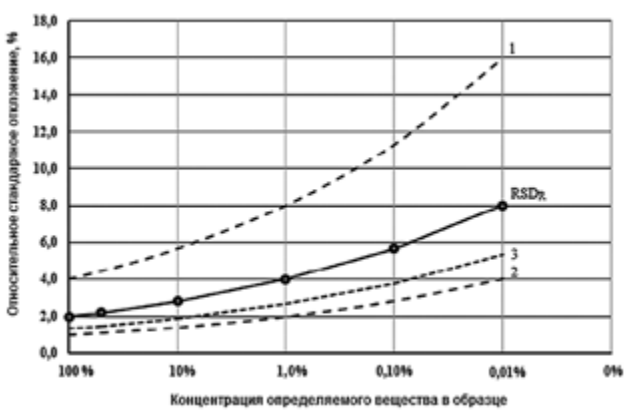


Рисунок 1. Зависимость относительного стандартного отклонения RSD_R, рассчитанного по формуле Горвица, от содержания определяемого вещества – сплошная линия. Пунктирные линии 1 и 2 – верхняя и нижняя границы значений «приемлемой» воспроизводимости по Горвицу соответственно; 3 – верхний предел приемлемых значений внутрилабораторной прецизионности = $0,67 \times RSD_R$

В настоящее время в качестве альтернативы оценки приемлемости значений RSD при валидации методик рассматривается подход Хорратa (Horrat), использующий так называемые коэффициенты Хорратa [20] – отношение экспериментально найденного относительного стандартного отклонения к стандартному отклонению, вычисленному по формуле Горвица (1):

для повторяемости

$$HORRAT_r = \frac{RSD_r, \%}{PRSD_r, \%} \quad (2)$$

для внутрилабораторной прецизионности

$$HORRAT_R = \frac{RSD_R, \%}{PRSD_R, \%} \quad (3)$$

Отметим, что значение RSD_R правильнее вычислять на основании дисперсионного анализа (ANOVA, см. ниже способ 4) [29], а не брать совокупное стандартное отклонение результатов двух химиков. В качестве приемлемых значений коэффициента Хорратa рассматривают: для межлабораторной воспроизводимости – интервал от 0,5 до 2; для результатов анализов в одной лаборатории для повторяемости – от 0,2 до 0,3; для внутрилабораторной прецизионности – от 0,2 до 1 [29]. Однако использование интервала значений коэффициента Хорратa противоречит сути RSD: чем меньше экспериментально найденное относительное стандартное отклонение, тем лучше прецизионность методики. Следовательно, должно быть предельное значение коэффициента Хорратa, а не интервал значений. Неудивительно поэтому, что для оценки приемлемости методик по показателю «внутрилабораторная прецизионность» имеется рекомендация использовать предельное значение коэффициента Хорратa ≤2 [6] или даже меньшее значение коэффициента Хорратa, например ≤1,3 [25].

Подчеркнем, что у способа 2, при всей привлекательности оценки внутрилабораторной прецизионности по простой формуле Горвица или по критерию Хорратa, имеется существенный недостаток: этот способ основан на эмпирической зависимости, которая, естественно, не может охватить все реальные результаты. *Поэтому для фармации рекомендуется использовать способ 2 для предварительной оценки внутрилабораторной прецизионности* [3 (С. 47)]. Это касается прежде всего методик количественного определения. Дело в том, что в области высоких концентраций определяемого вещества в образце концентрация мало влияет на прецизионность [3]: экспериментальные значения RSD в зависимости от концентрации могут расти даже медленнее, чем расчетное по фор-

муле Горвица. Напротив, для примесей в области малых концентраций экспериментальные значения RSD растут значительно быстрее, чем оценочные значения по формуле Горвица, то есть экспериментальные значения RSD получаются даже больше, чем расчетные для тех же концентраций [3, 30]. *Поэтому для методик определения содержания примесей оценка внутрилабораторной прецизионности на основании формулы Горвица или коэффициента Хоррата, возможно, приемлема, но это требует дополнительного изучения.*

Способ 3. Оценка внутрилабораторной прецизионности с использованием F-критерия Фишера и t-критерия Стьюдента [2]

Готовят не менее 6 испытуемых растворов определяемого вещества при концентрации, близкой к номинальной. Каждый из растворов: а) готовится независимо от других растворов в соответствии с валидируемой методикой, б) хроматографируется как минимум 3 раза. Для каждого из растворов находят среднее значение содержания определяемого вещества по результатам каждого из химиков $\bar{X}_i$ и $\bar{X}_j$. Проводят статистическую обработку этих значений и определяют обобщенные средние результаты $X_1 = \sum X_i/n$ *и* $X_2 = \sum X_j/n$, стандартные отклонения SDi и SDj относительные стандартные отклонения RSDi и RSDj отдельного результата.

Требование: сначала с помощью F-критерия Фишера показывают, что статистически эквивалентны стандартные отклонения SDi и SDj, результатов анализа, полученных разными химиками. Для этого вычисляют критерий Фишера как отношение большей дисперсии результатов анализов к меньшей дисперсии и сравнивают с табличным значением критерия Фишера F(*P, f1, f2*) для доверительной вероятности *P=95% и числа степеней свободы* $f_1=(n_1-1)$, $f_2=(n_2-1)$. *Условием статистической эквивалентности результатов анализа, полученных разными химиками, является следующее выражение:*

$$F = \frac{SD^2_{\text{большее}}}{SD^2_{\text{меньшее}}} < F(P, \quad f_1 = n_1 - 1, \quad f_2 = n_2 - 1). \qquad (4)$$

Затем доказывают, что средние результаты статистически достоверно (P=95%) не отличаются друг от друга. Для этого вычисляют критерий *t*:

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{SD_1^2}{n_1} + \frac{SD_2^2}{n_2}}} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\frac{SD_1^2 + SD_2^2}{n}}}, \qquad (5)$$

где $\bar{X}_i$ *и* $\bar{X}_j$ – средние результаты анализов, полученных химиками «1» и «2», SD_1 и SD_2 – стандартные отклонения отдельных определений при числе параллельных определений n_1 и n_2 соответственно (обычно $n_1=n_2=n$). Сравнивают расчетную величину t с табличным значением t-критерия Стьюдента t (P=95%; $f=n_1+n_2-2$) для доверительной вероятности P=95% и $f=n_1+n_2-2$ степеней свободы. Если расчетное значение *t* меньше табличного, то с 95%-й вероятностью можно сделать заключение о статистической незначимости различия средних результатов анализа, полученных двумя химиками. В противном случае средние результаты различаются статистически сильнее, чем это допускает случайная ошибка внутри серий анализа [34].

Достоинством способа 3 является то, что он основан на строгой теоретической базе. Однако он имеет существенный недостаток. При небольших значениях стандартных отклонений SD << 1 *t*-критерий может указывать на статистически значимое отличие даже при близких, практически одинаковых значениях сравниваемых результатов анализов. Это вызвано тем, что t-критерий пропорционален отношению систематических и случайных ошибок.

В таблице 2 в качестве примера приведены исходные данные и результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения основного вещества в лекарственном препарате способом 3. Из таблицы 2 видно, что для дозировки 30 мг расчетное значение F-критерия Фишера 1,62 меньше табличной величины 5,05. То есть дисперсии результатов анализа обоих химиков статистически эквивалентны. Следовательно, можно использовать оценку внутрилабораторной прецизионности по t-критерию Стьюдента. Так как расчетное значение t = 3,46 больше табличного t(P=95%; f=10) = 2,23, то получаем вывод о статистической значимости различия средних результатов двух химиков. Однако это не говорит о неприемлемости внутрилабораторной прецизионности методики, поскольку с практической точки зрения различие средних результатов анализа $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$ незначимо: (30,55–30,33)×100/[(30,55+30,33)/2]=0,72% при допуске содержания основного вещества ±7,5% относительно номинального значения по спецификации.

Для дозировки 60 мг (таблица 2) расчетные значения критериев F-Фишера и t-Стьюдента меньше соответствующих табличных величин. Это является достаточным основанием для вывода о внутрилабораторной прецизионности методики.

Способ 4. Оценка внутрилабораторной прецизионности методом одностороннего ANOVA

Этот способ также является статистически строгим. ANOVA (Analysis of Variances) может использоваться как при оценке внутрилабораторной прецизионности, так и при оценке межлабораторной

воспроизводимости (при трансфере методик). Для практического использования ANOVA важно, что обсчет результатов анализа легко проводится с помощью распространенного программного обеспечения, например Excel. Как правило, используют односторонний вариант – one-way ANOVA, а в качестве сравниваемых групп рассматривают результаты анализа каждого из химиков. Алгоритм ANOVA в Excel подробно изложен, например, в «Basic Concepts for ANOVA» [http://www.real-statistics.com/one-way-analysis-of-variance-anova/basic-concepts-anova], и поэтому не будем его рассматривать. Тем не менее для понимания сути вычислений независимо от используемой программы отметим, что при ANOVA определяются три вида прецизионности:

Таблица 2.

Результаты анализа порошка таблеток препарата 30 мг и 60 мг, полученные двумя химиками в одной аналитической лаборатории в разные дни и на разных приборах, для оценки внутрилабораторной прецизионности

№	Таблетки 30 мг		Таблетки 60 мг	
	Химик 1, мг/табл	Химик 2, мг/табл	Химик 1, мг/табл	Химик 2, мг/табл
1	30,43	30,38	57,72	57,59
2	30,40	30,66	57,31	58,19
3	30,33	30,61	57,66	57,98
4	30,16	30,52	58,00	57,94
5	30,30	30,45	57,93	58,14
6	30,37	30,69	57,86	57,35
Среднее значение	30,33	30,55	57,75	57,87
Стандартное отклонение (SD)	0,09621	0,1226	0,2488	0,3289
Дисперсия (SD^2)	0,009257	0,01502	0,06191	0,10819
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	0,32	0,40	0,43	0,57
Расчетное значение F-критерия Фишера	1,62		1,75	
Табличное значение F-критерия Фишера	5,05		5,05	
Расчетное значение t-критерия Стьюдента	3,46		0,70	
Табличное значение t-критерия Стьюдента	2,23		2,23	

a) Внутригрупповая прецизионность (within-group precision; Within Group in Excel) выражает вклад случайных ошибок во внутрилабораторную прецизионность:

$$SD_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n}(X_{ij}-\bar{X}_i)^2}{p\cdot(n-1)} = \frac{\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n}[(X_{ij}-\bar{X}_i)^2]/(n-1)}{p} =$$

$$= \frac{\sum_{i=1}^{p} SD_i^2}{p} = \frac{SD_1^2 + SD_2^2}{2}. \quad (6)$$

$$X_i = \frac{\sum_j^n X_{i,j}}{n}, \quad (7)$$

где p – количество групп (в нашем случае химиков), n – количество результатов анализа в группе, индекс i – номер группы, j – номер результата анализа в группе. В формуле (6) правая часть уравнения записана в предположении, что исследования проводятся двумя химиками (в разные дни на разных приборах). Каждый химик анализирует по n=6 проб одного и того же образца на уровне около 100% номинального содержания по валидируемой методике в соответствии с рекомендацией ICH и получает n результатов со значениями дисперсий соответственно SD_1^2 и SD_2^2. Альтернатива также по ICH: каждый химик анализирует как минимум по 9 проб не менее чем на трех уровнях концентраций, одинаковых для обоих химиков.

b) Межгрупповая прецизионность (between-group precision; Between Group in Excel) выражает вклад систематических ошибок:

$$S_g^2 = S_{\bar{X}}^2 - \frac{S_r^2}{n} = \frac{\sum_{i=1}^{p}(\bar{X}_i-\bar{X})^2}{(p-1)} - \frac{S_r^2}{n} = \frac{[(\bar{X}_1-\bar{X})^2+(\bar{X}_2-\bar{X})^2]}{(p-1)} - \frac{S_r^2}{n}, \quad (8)$$

где $\bar{X}_1$ *и* $\bar{X}_2$ – средние результаты анализа, полученные двумя химиками, $\bar{X}$ – среднее значение совокупности результатов анализа обоих химиков. $\bar{X}$ вычисляется путем суммирования всех результатов анализа и делением полученной суммы на произведение p×n:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n} X_{ij}}{p\cdot n}. \quad (9)$$

c) Внутрилабораторная прецизионность (intermediate precision; Total in Excel), являющаяся основной целью расчетов, представляет собой сумму внутригрупповой и межгрупповой прецизионностей:

$$S_R^2 = S_r^2 + S_g^2. \quad (10)$$

При валидации методик с использованием ANOVA внутрилабораторная прецизионость рассматривается как приемлемая, если расчетное значение F<Fкритическое. Отметим, что при использовании

Таблица 3.

Результаты ANOVA при оценке внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения таблеток 30 мг (на основании исходных данных таблицы 2)*

Однофакторный дисперсионный анализ						
ИТОГИ						
Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия		
Столбец 1	6	181,99	30,3316667	0,009256667		
Столбец 2	6	183,31	30,5516667	0,015016667		
Дисперсионный анализ						
Источник вариации	SS	df	MS	F	P-значение	F критическое
Между группами	0,1452	1	0,1452	11,96374622	0,006134404	4,964602744
Внутри групп	0,1213667	10	0,01213667			
Итого	0,2665667	11				

Примечание: * – пример Excel-таблицы.

Таблица 4.

Результаты ANOVA при оценке внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения таблеток 60 мг (на основании исходных данных таблицы 2)*

Однофакторный дисперсионный анализ						
ИТОГИ						
Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия		
Столбец 1	6	346,48	57,7466667	0,061906667		
Столбец 2	6	347,19	57,865	0,10819		
Дисперсионный анализ						
Источник вариации	SS	df	MS	F	P-значение	F критическое
Между группами	0,0420083	1	0,04200833	0,493934821	0,49821141	4,964602744
Внутри групп	0,8504833	10	0,08504833			
Итого	0,8924917	11				

Примечание: * – пример Excel-таблицы.

ANOVA имеется ограничение, обусловленное теми же причинами, что и при использовании способа 3.

В качестве примера в таблицах 3 и 4 представлены результаты обсчета в Excel исходных данных по результатам анализа химиков из таблицы 2. При этом в таблицах 3 и 4 используются следующие обозначения, характерные для Excel: Группы (Gopups) – в нашем случае – химики; Счет (Count) – количество результатов анализа (количество проанализированных проб) в каждой группе; Сумма (Sum) – сумма результатов анализа; Среднее (Mean) – среднее значение результатов анализа; Дисперсия (Variance) – значение дисперсии; SS – сумма квадратов отклонений от средних значений $\overline{X}_i$ (внутригрупповая сумма квадратов отклонений)

или от совокупного среднего значения $\bar{X}$ для всех групп (межгрупповая сумма квадратов отклонений); df – число степеней свободых; MS = SS/df – среднее квадратическое (Mean Square); F – экспериментальное значение критерия Фишера для заданной величины α (вероятности отрицания нулевой гипотезы о статистической эквивалентности значений F; обычно α=0,05, что соответствует 95% доверительной вероятности); *p* – расчетная оценка значения α; Fкритическое (Fcrit) – критическое, табличное значение F-критерия Фишера.

Из таблиц 3 и 4 видно, что для дозировки 60 мг (таблица 4) F < Fкритическое, то есть внутрилабораторная прецизионность подтверждена, а для дозировки 30 мг (таблица 3) F > Fкритическое, то есть внутрилабораторная прецизионность не подтверждена, как и в случае использования способа 3. И это несмотря на то, что в ANOVA вычисляются другие по смыслу и по значениям критерии по сравнению со способом 2. Это говорит о том, что в ANOVA выводы о внутрилабораторной прецизионности методик также зависят от соотношения случайных и систематических ошибок. При малых случайных ошибках систематическая ошибка может оказаться статистически значимой. Это легко можно оценить, например, по отношению $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$ к полусумме средних результатов анализа в процентах (как для способа 3) или, что более надежно, сравнением с максимально допустимой неопределенностью анализа (см. ниже).

Таким образом, при использовании для оценки внутрилабораторной прецизионности способа 3, основанного на F-критерии Фишера и t-критерии Стьюдента, или при использовании способа 4 (ANOVA) выполнение критериальных требований является достаточным, но не обязательным условием для заключения о внутрилабораторной прецизионности валидируемой методики.

Способ 5. Оценка внутрилабораторной прецизионности сравнением доверительного интервала совокупности результатов анализа химиков Δ_{intra} с максимально допустимой относительной неопределенностью анализов $max\Delta_{As}$ [9, 12, 35]

При этом способе оценки внутрилабораторной прецизионности используется неравенство: доверительный интервал Δ_{intra}, % совокупности результатов, полученных в разных условиях (разные химики, дни, оборудование), не должен превышать максимально допустимой относительной неопределенности анализа $max\Delta_{As}$:

$$\Delta_{intra}, \% = t[P = 95\%, (f = n\times(m - 1)] \times \times SD_{Z\text{-}intra}, \% \le max\Delta_{As}. \quad (11)$$

Для субстанций

$$max\Delta_{As} = B \quad (12)$$

Для ГЛС

$$max\Delta_{As} = 0{,}32 \times B, \quad (13)$$

где для субстанций $B = B_H - 100$, для готовых лекарственных средств (ГЛС) $B = (B_H - B_L)/2$; B_H и B_L – соответственно верхняя и нижняя граница нормируемого содержания определяемого вещества в %. «Анализируют n=5 (навесок) одной и той же серии исследуемого препарата в m=3 разных дня… Все полученные результаты (Z) должны принадлежать одной и той же генеральной совокупности. Поэтому для них рассчитывают объединенное среднее значение (Z-intra), стандартное отклонение ($SD_{Z\text{-}intra}$, %), относительный доверительный интервал Δ_{intra}, %» [9, 12].

Подчеркнем, что использование формулы (11) имеет ограничение: сначала требуется подтвердить, что все полученные результаты принадлежат одной и той же генеральной совокупности. То есть сначала надо с помощью F-критерия Фишера проверить, что расчетное значение F-критерия Фишера меньше табличного значения [как и в способе 3 – по формуле (4)]. В случаях, когда это требование не выполняется, способ 5 неприемлем для оценки внутрилабораторной прецизионности. Кроме этого, отметим, что в соответствии с рекомендациями ICH в формуле (11) для методик контроля качества лекарственных субстанций и ГЛС следует брать n=6 и m=2.

Альтернативой способу 5 является представленный ниже способ 6, также использующий максимально допустимую неопределенность результатов анализа, но не требующий соответствия отношения дисперсий значению F-критерию Фишера и учитывающий не только случайные, но и систематические ошибки.

Способ 6 (новый). Оценка внутрилабораторной прецизионности путем сравнения максимального различия относительных средних результатов анализа химиков Δ_{MAX} с максимально допустимой относительной неопределенностью анализов $max\Delta_{AS}$

Способ 6 применим для методик, для которых нормируется верхняя граница или верхняя и нижняя границы допустимого содержания определяемого вещества.

При оценке внутрилабораторной прецизионности методик фактически требуется оценить приемлемость различия результатов, получаемых разными химиками. Для этого логично сравнивать максимально возможное значение разности *относительных* средних результатов анализа химиков Δ_{max} с максимально допустимой *относительной* неопределенностью результатов анализов $max\Delta_{As}$. Учитывая выражение для $max\Delta_{As}$ [9, 12, 35], *условие приемлемости внутрилабо-*

раторной прецизионности методики можно записать в виде неравенства:

Для методик с верхней нормируемой границей содержания определяемого вещества (в частности для методик анализа субстанций):

$$\Delta_{max} = |\bar{X}_1 - \bar{X}_2| + (\Delta\bar{X}_1 + \Delta\bar{X}_2) \leqslant \max \Delta_{As} = B. \quad (14)$$

Для методик с верхней и нижней нормируемыми границами определяемого вещества (методики контроля качества ГЛС):

$$\Delta_{max} = |\bar{X}_1 - \bar{X}_2| + (\Delta\bar{X}_1 + \Delta\bar{X}_2) \leqslant \max \Delta_{As} = k \cdot B/2 = 0{,}32 \cdot (B_H - B_L)/2, \quad (15)$$

где $\bar{X}_1$ и $\bar{X}_2$ – средние результаты анализа химиков, выраженные как относительные величины в % (относительно номинального содержания определяемого вещества в случае ГЛС; процентное содержание в случае субстанций и примесей); $\Delta\bar{X}_1$ и $\Delta\bar{X}_2$ – доверительные интервалы значений $\bar{X}_1$ и $\bar{X}_2$ ($\Delta\bar{X}_i = t \cdot SD_i/\sqrt{n}$); t – критерий Стьюдента, SD – стандартное отклонение, n – количество *результатов анализа химика; B = B_H – 100 – для субстанций, B= B_H – для примесей, B = (B_H – B_L)/2 – для ГЛС; B_H и B_L – верхняя и нижняя границы нормируемого содержания определяемого в*ещества в % соответственно. Значение коэффициента k=0,32 соответствует доверительной вероятности 95%, общепринятой в аналитической химии.

Значение коэффициента k определяется из так называемого принципа незначимости. Он заключается в следующем [9, 12]: «Доверительный интервал Δ_2 является значимым на уровне P% [незначимым на уровне (100–*p)* %] по сравнению с доверительным интервалом Δ_1, если объединенный доверительный интервал Δ_P превышает Δ_1 не более чем на *p*%», т.е.

$$\Delta_p = \sqrt{\Delta_1^2 + \Delta_2^2} \leqslant \left[\frac{100 + p}{100}\right] \cdot \Delta_1. \quad (16)$$

Из (16)

$$\Delta_2 \leqslant \sqrt{\left(1 + \frac{p}{100}\right)^2 - 1} \cdot \Delta_1 = k \cdot \Delta_1 \quad и \quad k = \sqrt{\left(1 + \frac{p}{100}\right)^2 - 1}, \quad (17)$$

где *p*=(100–P),%. Подставляя в (17) *p*=5, получаем для доверительной вероятности P=95% k=0,32. Заметим, что с увеличением доверительной вероятности значение k уменьшается: для P=99 % k=0,14, для P=99,9% k=0,045, при этом соответственно возрастают требования к внутрилабораторной прецизионности методики.

В таблице 5 в качестве примера представлены результаты применения способа 6 для оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения содержания лекарственного вещества в препарате. Видно, что для обеих дозировок, 30 мг и 60 мг, выполняется условие приемлемости внутрилабораторной прецизионности: Δ_{MAX} для дозировки 30 мг составляет 1,50, а для дозировки 60 мг – 1,21, что соответствует требованию критерия приемлемости: $\Delta_{MAX} \leq \max\Delta_{As} = 2{,}40$.

Способ 6 дает возможность наглядно показать, что использование только совокупного стандартного отклонения RSD_T или только доверительного интервала Δ_{intra} (способ 5) может приводить к ошибочному заключению о приемлемости внутрилабораторной прецизионности: различие средних результатов (с учетом доверительных интервалов) превышает допустимую максимальную неопределенность результатов анализа Δ_{As}. На рисунке 2 изображены зависимости Δ_{MAX}, RSD_T и Δ_{intra} от результатов анализа второго химика (X1) при неизменных результатах анализа первого химика (X2=const). Результаты анализа второго химика (отдельные результаты и соответственно средние значения) варьировали путем умножения на коэффициенты от 0,95 до 1,04 (ось абсцисс) и определяли, как изменяются при этом значения RSD_T, % – нижняя кривая, и Δ_{MAX}, % – верхняя кривая. То есть мо-

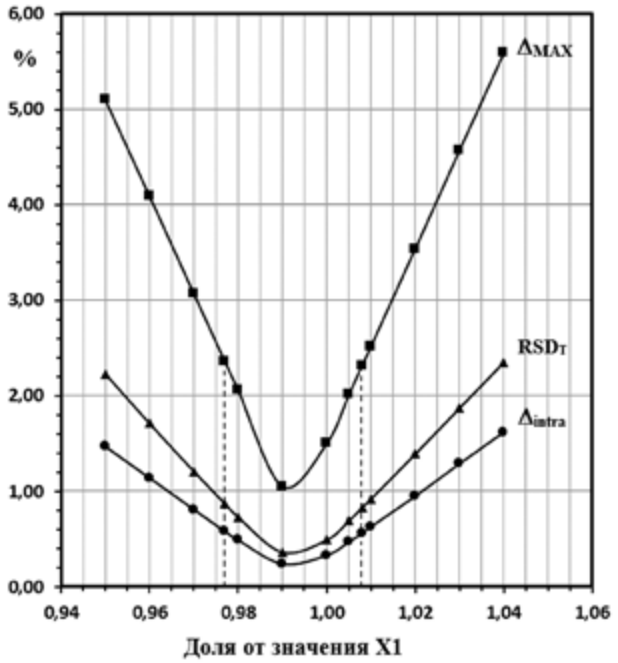


Рисунок 2. Зависимость максимальной разницы средних результатов анализа химиков Δ_{MAX} (способ 6), совокупного относительного стандартного отклонения RSD_T (способ 1) и доверительного интервала совокупности результатов анализа химиков Δ_{intra} (способ 5) от варьируемых результатов анализа X1 при неизменных X2. Пунктирными линиями ограничена область приемлемых значений внутрилабораторной прецизионности, которая соответствует максимально допустимой неопределенности результатов Δ_{As}=2,40% (таблица 5, таблетки препарата дозировкой 30 мг)

Таблица 5.

Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики определения лекарственного вещества в таблетках препарата 30 мг и 60 мг способом 6

№	Таблетки 30 мг		Таблетки 60 мг	
	Химик 1, мг/табл (X_2)	Химик 2, мг/табл (X_1*)	Химик 1, мг/табл (X_2)	Химик 2, мг/табл (X_1*)
1	30,43	30,38	57,72	57,59
2	30,4	30,66	57,31	58,19
3	30,33	30,61	57,66	57,98
4	30,16	30,52	58,00	57,94
5	30,30	30,45	57,93	58,14
6	30,37	30,69	57,86	57,35
Средний результат анализа, мг	30,33	30,55	57,75	57,87
Стандартное отклонение SD, мг	0,096212	0,122543	0,248811	0,328922
Стандартное отклонение SD, %	0,320705	0,408475	0,414684	0,548204
Количество результатов анализа (проб) n	6		6	
Число степеней свободы f=n–1	5		5	
Критерий Стьюдента t	2,57		2,57	
Верхняя нормируемая граница, B_H, %	107,5		107,5	
Нижняя нормируемая граница, B_L, %	92,5		92,5	
Коэффициент k	0,32		0,32	
Максимально допустимая неопределенность анализов maxΔ_{As}	2,40		2,40	
Дозировка (содержание основного вещества, указываемое на этикетке), мг	30		60	
Среднее значение X1, %	101,11		96,24	
Среднее значение X2, %	101,84		96,44	
Доверительный интервал ΔX1, %	0,34		0,44	
Доверительный интервал ΔX2, %	0,43		0,58	
Δ_{MAX} = (X1 + ΔX1) – (X2 – DX2), %	1,50		1,21	

Примечание: * – X_1 обозначены результаты второго химика, так как у его результатов больше стандартное отклонение SD (следовательно, и дисперсия), чем у результатов первого химика.

делировали влияние различия средних результатов анализа химиков на оценку внутрилабораторной прецизионности методики. Из рисунка 2 видно, что зависимости имеют форму; близкую к параболической. При этом Δ_{MAX},% находится в границах приемлемости $\Delta_{MAX} < \max\Delta_{As} = 2{,}40\%$ только в области от $0{,}977 \times X1$ до $1{,}008 \times X1$ (область, ограниченная пунктирными линиями). В то же время значения RSD_T и Δ_{intra} удовлетворяют критерию приемлемости (соответственно ≤2,0% и ≤2,4%) в более широкой области значений X1, там, где Δ_{MAX} превышает максимально допустимую неопределенность результатов анализов. То есть при использовании способов 1 и 5 имеется риск получения ошибочных заключений о приемлемости внутрилабораторной прецизионности методик. Отметим, что в случае способа 5 этот риск можно исключить, если проверять незначимость различия средних результатов анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе рассмотрены способы оценки внутрилабораторной прецизионности аналитических методик в фармации. Критерии приемлемости и недостатки (ограничения) этих способов, а также рекомендации по их применению систематизированы в таблице 6. Основные рекомендации следующие:

- **Способ 1 (**оценка внутрилабораторной прецизионности по совокупному стандартному отклонению RSD_T) не рекомендуется использовать для методик определения содержания основных веществ.
- **Способ 2** (оценка внутрилабораторной прецизионности на основании формулы Горвица или коэффициенте Хорората) не рекомендуется использовать как для методик определения содержания основных веществ, так и для методик определения примесей.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности методик рекомендуется использовать любой из способов 3–6, поскольку они являются теоретически обоснованными, но только с учетом их ограничений.

При использовании способов 3 и 4 (оценка по критериям F-Фишера и t-Стьюдента) выполнения критериев приемлемости достаточно для заключения о внутрилабораторной прецизионности методики. Однако существует вероятность того, что можно получить ошибочное заключение о несоответствии внутрилабораторной прецизионности методики критериям приемлемости в случае неблагоприятного соотношения систематических и случайных ошибок. Поэтому в случае отрицательного заключения по способам 3 и 4 следует использовать другой способ оценки внутрилабораторной прецизионности.

При использовании способа 5 (сравнение доверительного интервала совокупности результатов анализа химиков с максимальной относительной неопределенностью анализов) необходимо *предварительно* оценивать незначимость различия средних результатов анализа.

Наиболее универсальным для оценки внутрилабораторной прецизионности является способ 6 (сравнение максимального различия относительных средних результатов Δ_{MAX} с максимально допустимой относительной неопределенностью анализа Δ_{AS}). Он не зависит от соотношения случайных и систематических ошибок, не требует статистической эквивалентности выборок по F-критерию Фишера и не связан с эмпирическими формулами.

ЛИТЕРАТУРА

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH. 2005.
2. Н.А. Эпштейн. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ-методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Хим.-фарм. Журн. 2004. Т. 38. № 3. С. 40–56; N.A. Epshtein. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2004. V. 38. № 4. P. 212-229. URL: http://www.chem.folium.ru/index.php/chem/article/view/2339/1826 (дата обращения 15.01.2016).
3. Й. Эрмер, Д. Х. МакБ. Миллер. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик. – М.: ВИАЛЕК, 2013. 495 с.; J. Ermer, J.H. McB. Miller. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. 403 p.
4. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. – М.: Госстандарт России, 2002.
5. РМГ 61 – 2010. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. – М.: Стандартинформ, 2012.
6. Ч.Ч. Чан. Валидация аналитических методик: принципы и подходы // Производство лекарственных средств. Контроль качества и регулирование. Практическое руководство / Пер. с англ. под ред. В.В. Береговых. – СПб.: ЦОП «Профессия», 2013. С. 831–903.
7. МИ 2335-2003. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа. – Екатеринбург. 2003. 79 с.

Таблица 6.

Сводная таблица способов оценки внурилабораторной прецизионности (ВП) при валидации аналитических методик

	Наименование	Критерии приемлемости	Недостатки (ограничения)	Рекомендации / Примечания
Способ 1	Оценка внутрилабораторной прецизионности по относительному стандартному отклонению совокупности результатов двух химиков RSD_T	Для основных веществ $RSD_T \leq 2,0$. Для примесей – см. таблицу 1	Может давать завышенную оценку приемлемости ВП	Не рекомендуется использовать для методик определения содержания основных веществ
Способ 2	Оценка внутрилабораторной прецизионности по формуле Горвица или по связанному с ней критерию Хоррата	$RSD_T < 0,67 \times RSD_R$, где RSD_R – значение RSD, вычисленное по формуле Горвица с использованием концентрации определяемого вещества, выраженной в массовых долях С. Коэффициент Хоррата ≤2	Эмпирический подход	Только для предварительной оценки ВП [3]
Способ 3	Оценка внутрилабораторной прецизионности с использованием F-критерия Фишера и t-критерия Стьюдента	$F < F(P=9\ 5\%; f_1 = n_1 - 1, f_2 = n_2 - 1)$ и $t < t(P=95\%; f = n_1 + n_2 - 2)$	Существует вероятность получения ошибочного заключения о внутрилабораторной прецизионности методики в случае неблагоприятного соотношения систематических и случайных ошибок	В случае невыполнения требования t-критерия Стьюдента использовать другой способ оценки ВП
Способ 4	Оценка внутрилабораторной прецизионности методом одностороннего ANOVA	*F < Fкритическое*	Недостаток такой же, что и для способа 3	В случае невыполнения требования F-критерия Фишера использовать другой способ оценки ВП
Способ 5	Оценка внутрилабораторной прецизионности сравнением доверительного интервала совокупности результатов анализа химиков Δ_{intra} с максимально допустимой относительной неопределенностью анализов $\max\Delta_{As}$	$\Delta_{intra},\% \leq \max \Delta_{As},\%$	Не учитывается влияние на вывод о приемлемости ВП различия средних результатов анализа химиков. А без учета незначимости этого различия имеется риск получения завышенной оценки приемлемости ВП	Способ 5 использовать, если различие между средними результатами анализа химиков незначимо с практической точки зрения
Способ 6	Оценка внутрилабораторной прецизионности путем сравнения максимального различия относительных средних результатов анализа химиков Δ_{MAX} с максимально допустимой относительной неопределенностью анализов Δ_{max}	$\Delta_{max} \leq \max \Delta_{As},\%$		Рекомендуется для широкого использования в фармации. С помощью этого способа показана возможность ошибочного вывода о приемлемости ВП методики при использовании способа 1

8. МИ 2336-2002. ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. – Екатеринбург. 2004. 45 с.
9. А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпружников. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта // Фармаком. 2004. № 3. С. 1–15.
10. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна, М.А. Гетьмана, А.А. Малина. – М. 2007. 57 с.
11. А.Н. Смагунова, У.В. Ондар, В.А. Козлов. Изменение смыслового содержания терминов метрологических характеристик методик выполнения измерений в количественном химическом анализе // Аналитика и контроль. 2010. Т. 14. № 4. С. 254–259.
12. А.И. Гризодуб. Стандартизованные процедуры методик контроля качества лекарственных средств // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств. Т. 3. – Харьков: Изд. НТМТ, 2011. С. 934–1063.
13. Э. Причард, В. Барвик. Контроль качества в аналитической химии / Пер. с англ. под ред. И.В. Болдырева. – СПб.: ЦОП «Профессия», 2012. 320 с.; E. Prichard and V. Barwick. Quality Assurance in Analytical Chemistry. – Chichester (UK): John Wiley & Sons, Ltd, 2007. 316 p.
14. United States Pharmacopoeia. USP38–NF33. 2015.
15. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). – Washington. 1994.
16. J. M. Green. A Practical Guide to Analytical Method Validation // Analytical Chemistry News & Features. 1996. P. 305A–309A.
17. L. Huber. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. – N.Y.: Informs Healthcare USA Inc., 2007. 303 p.
18. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. Method validation programs (OMAIPVM Department). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. 2000.
19. J.B. Crowther, J.M. Miller. Qualification of laboratory instrumentation, validation, and transfer of analytical methods // Analytical Chemistry in a GMP Environment. A practical guide. – N.Y.: Wiley, 2000. P. 423–458.
20. Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes. / CX/MAS. 2001.
21. R. Ficarra. Validation of a LC method for the analysis of zafirlukast in a pharmaceutical formulation // J. Pharm. Biomed. Analysis. 2000. V. 23. № 1. P. 169–174.
22. R. Boqué, A. Maroto, J. Riu and F. Rius. Validation of Analytical Methods // Grasas y Aceites. 2003. V. 53. P. 128–143.
23. I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance // Trends in Analytical Chemistry. 2004. V. 23. № 8. P. 535–552.
24. D.M. Bliesner. Validating Chromatographic Methods. A Practical Guide. – New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2006. 291 pp.
25. A. Gonzalez, M. Herrador. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles // Trends Analyt. Chem. 2007. V. 26. № 3. P. 227–238.
26. D. Chesher. Evaluating Assay Precision // Clin. Biochem. Rev. 2008. V. 29. P. 23–24.
27. T. Ellison, V. Borwik, T. Farrant. Practical Statistics for the Analytical Scientist. A Bench Guide. 2nd Ed. – Cambridge: LGC Limited, 2009. 283 p.
28. Validation of analytical procedures. 1-st ed. – Bonn: B.A.H. 2009. 224 p.
29. A.G. Gonzalez, M.A. Herrador, G. Agustin, A.G. Asuero. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards // Talanta. 2010. V. 82. P. 1995–1998.
30. R. Albert and W. Horwitz. A heuristic derivation of the Horwitz curve // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 789–790.
31. AOAC Official Methods of Analysis, Interlaboratory Collaborative Study, Appendix D. 2002. 12p. URL: http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/Collaborative_Study_Validation_Guidelines.pdf (дата обращения 15.01.2016).
32. W. Horwitz, L.R. Kamps and K.W. Boyer. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1980. V. 63. P. 1344–1354.
33. T.P.J. Linsinger, R.D. Josephs. Limitations of the application of the Horwitz equation // Trends Analyt. Chem. 2006. V. 25. № 11. P. 1125–1130.
34. К. Дерффель. Статистика в аналитической химии. – М.: Мир, 1994. С. 173–175.
35. Д.А. Леонтьев, А.И. Гризодуб. Метрологический контроль результатов анализа. Специфика применения концепции неопределенности в фармацевтическом анализе // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 4 (5). С. 68–75.

УДК 582.284.5, 615.281, 578.832

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ МАНЖЕТКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*ALCHEMILLA VULGARIS* L.)

Н.А. Мазуркова[1]*, Т.А. Кукушкина[2], Г.И. Высочина[2], Ж.Б. Ибрагимова[1], И.Е. Лобанова[2], Е.И. Филиппова[1], О.Ю. Мазурков[1], Е.В. Макаревич[1], Л.Н. Шишкина[1], А.П. Агафонов[1]

1 – Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»), 363559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово

2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН (ЦСБС СО РАН), 630090, Россия, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

1 – State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia

2 – Central Siberian Botanical Garden SB RAS, 101, Zolotodolinskaya str., Novosibirsk, 630090, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: mazurkova@vector.nsc.ru
Тел.: 8 (383) 363 47 00 доб. 22 20

Резюме. В статье представлены сведения о распространении, применении в народной медицине, химическом составе растительного сырья, фармакологическом изучении манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), а также результаты изучения в культуре клеток Vero токсических и антивирусных свойств водных растворов сухого этанольного извлечения из надземной части и этилацетатного извлечения из корней манжетки обыкновенной, произрастающей в Западной Сибири, в отношении вируса простого герпеса. Показано, что экстракты, полученные как из надземной части, так и из корней растения, обладают *in vitro* антивирусной активностью в отношении вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов.

Ключевые слова: экстракты манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), противовирусная активность, вирус простого герпеса.

STUDY OF ANTIHERPETIC ACTIVITY OF LADY'S MANTLE (*ALCHEMILLA VULGARIS* L.) EXTRACTS

N.A. Mazurkova[1], T.A. Kukushkina[2], G.I. Vysochina[2], Z.B. Ibragimova[1], I.E. Lobanova[2], E.I. Filippova[1], O.Yu. Mazurkov[1], E.V. Makarevich[1], L.N. Shishkina[1], A.P. Agafonov[1]

Abstract. The article presents information on the distribution, on the use in traditional medicine, the chemical composition of plant material, pharmacological study of lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L.), as well as the results of a study in culture Vero cell toxicity and antiviral properties of aqueous solutions of dry ethanol extract of the aerial parts and the ethyl acetate extract of the roots of lady's mantle, growing in Western Siberia, in respect of the herpes simplex virus. It is shown that the extracts derived from both aerial parts and roots of plants have on the Vero cell culture antiviral activity against herpes simplex virus of 1 and 2-type.

Keywords: extracts of lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L.), antiviral activity, herpes simplex virus.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время инфекция, вызываемая вирусами герпеса 1 и 2 типов (рисунок 1), занимает одно из лидирующих мест среди вирусных заболеваний человека. Согласно опубликованным 28 января 2015 г. в журнале PLOS ONE первым глобальным оценкам ВОЗ распространенности вируса простого герпеса типа 1 (ВПГ-1), этим вирусом инфицированы более 3,7 млрд человек в возрасте до 50 лет, или 67% населения [1]. Кроме того, по оценке ВОЗ, сделанной в январе 2015 г., 417 млн человек в возрасте 15–49 лет имели инфекцию ВПГ-2, вызывающую генитальный герпес [2, 3]. Ежегодно, согласно расчетам, вирусом ВПГ-2 заражаются около 20 млн человек [2, 3].

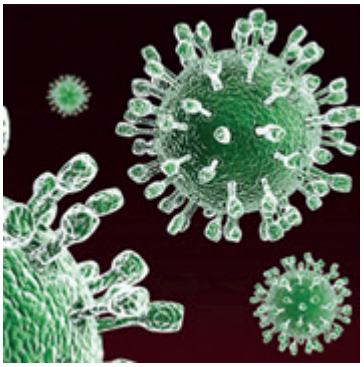


Рисунок 1. Вирус простого герпеса

Для лечения герпетической инфекции используют иммуномодуляторы, патогенетические и симптоматические средства, а также химиопрепараты, действующие непосредственно на вирусы [4]. Противовирусные препараты, применяемые в настоящее время против герпеса, имеют синтетическое (ацикловир, зовиракс, лавомакс, валтрекс, фамвир, иммунорикс) [4, 5] или растительное происхождение (гипорамин, панавир, алпизарин, госсипол, хелепин) [6–11]. Согласно международным стандартам лечения герпесвирусных инфекций препаратами выбора являются ацикловир,

валтрекс и фамвир, которые селективно ингибирует герпесвирусную ДНК-зависимую ДНК-полимеразу, нарушая тем самым репликацию ДНК вируса [4, 5]. Однако для этих химических препаратов характерны быстрое появление резистентных к ним штаммов ВПГ, низкая биодоступность, а также высокая нефротоксичность. Все это обусловливает необходимость создания более эффективных препаратов против герпеса, в том числе и на основе биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения.

Противогерпетические препараты растительного происхождения по сравнению с химическими соединениями являются практически нетоксичными [6, 8, 10]. Среди последних известны препараты с разными механизмами действия на вирус. Так, гипорамин, представляющий собой экстракт на основе полифенольного комплекса, полученный из листьев облепихи крушиновидной [6], и панавир – экстракт побегов паслена клубневидного, содержащий гексозные гликозиды, блокируют синтез вирусной ДНК [7]. Алпизарин – экстракт копеечника альпийского и экстракт копеечника желтоватого, содержащий γ-ксантоновый С-гликозид мангиферин, препятствует проникновению вируса внутрь клетки [8]. Госсипол – экстракт семян и корней хлопчатника лохматого, представляющий собой природный полифенол, имеет как прямое инактивирующее воздействие на вирусы, взаимодействуя с оболочечными белками вирусных частиц, так и опосредованное, через механизмы индукции интерферонов [9]. Хелепин представляет собой экстракт леспедецы двуцветной, содержащий природную сумму флавоноидов, проявляет вирулицидную активность при местном применении [10].

Перечисленные выше растительные препараты при низкой токсичности имеют разную клиническую эффективность: от невысокой до сравнимой с активностью ацикловира. Вместе с тем разработка новых эффективных препаратов на основе манжетки обыкновенной может оказаться весьма перспективной для борьбы с герпесом. В связи с этим поиски новых природных источников БАВ, обладающих противовирусной активностью, как и расширение уже существующей базы фармакопейных лекарственных растений, в настоящее время по-прежнему актуальны. Многообразие биологически активных веществ растений определяет широту спектра их действия на организм человека в комплексной терапии различных заболеваний. Основой для современной отечественной фармации служат исследования лекарственных растений народной медицины. При введении таких растений в медицинскую практику в первую очередь проводится комплекс исследований, устанавливающих их видовую принадлежность и границы вида [12]. Это особенно актуально для рода *Alchemilla* L. (Rosaceae Juss.), как одного из таксонов, к систематике которого до сих пор не найдено рационального подхода. Большинство слагающих его рас возникло в ходе сложных гибридизационных процессов в прошлом, сопровождающихся резким повышением плоидности, нарушением полового процесса и переходом к апомиксису, изучение которого у манжеток имеет не только общебиологическое теоретическое значение, но и практическую направленность [13]. На основе результатов фармакогностического, ресурсоведческого изучения и анализа геномов для медицинского применения рекомендованы 13 видов этого рода [12]. Один из них – *Alchemilla vulgaris* L. (= *A. xanthochlora* Rothm., 1937), манжетка обыкновенная [14], – является сборным видом, включающим в себя от 5 до 40 апогамных форм (мелких видов) рода (рисунок 2). Этот факт отмечается многими исследователями [12, 13, 15–18].



Рисунок 2. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.)

Распространение

В мире насчитывается не менее 350 видов рода *Alchemilla* L. (преимущественно апомиктичных рас) в областях умеренного и холодного климата Евразии, Северной Америки и в горах тропиков (Африка). В Восточной Европе основными центрами формообразования и эндемизма манжетки были Карпаты, Крым, отчасти субарктические районы Скандинавии, но особенно Урал и Приуралье. В ряде случаев рассматривается влияние кавказского центра [19]. На территории бывшего СССР встречается 260 видов рода *Alchemilla* [20]. Манжетка обычно встречается во всех областях Средней России, в Средней и Центральной Сибири, Кемеровской области, Алтайском крае. Встречается на лугах, в степях, на полянах, в светлых лесах, на выгонах, у дорог, на лесосеках, опушках, среди кустарников [15, 21, 22].

Применение в народной медицине

Alchemilla vulgaris L. – манжетка обыкновенная, или манжетка желто-зеленая, является кормовым и лекарственным растением. Спектр биологической активности манжетки чрезвычайно широк: в народной медицине стран Западной Европы, как и в народной отечественной медицине, манжетка обыкновенная

применяется в качестве вяжущего, отхаркивающего, диуретического, гемостатического, ранозаживляющего и улучшающего обмен веществ средства, также она эффективна при эпилепсии, энтеритах, диабете, дисменорее, кожных заболеваниях. Сок, настой листьев используются наружно при опухолях, ранах, заболеваниях глаз [23]. Сообщается также об использовании манжетки обыкновенной при несварении желудка, вздутии и вялом кишечнике, катаре верхних дыхательных путей, туберкулезе легких, при поносах [24]. Считается, что манжетка эффективна при отеках и диабете, при гинекологических заболеваниях, чирьях, насморке и носовых кровотечениях [25, 26]. И это далеко не полный перечень возможного использования манжетки. Данных народной медицины о противовирусных свойствах манжетки обыкновенной нами не обнаружено.

Химический состав растительного сырья манжетки обыкновенной

Экспериментально доказано, что основным действующим началом *Alchemilla vulgaris* L. является полифенольный комплекс и в первую очередь флавоноиды [27, 28]. В надземных органах манжетки обыкновенной в разное время и разными исследователями были обнаружены флавонолы: кверцетин [27], астрагалин [27, 29, 30], рутин [29, 30], гиперозид [29], кемпферол [27, 31], рамноглюкозид кемпферола [31], изокверцитрин [27, 30] и кверцетин-3-O-D-арабинофуранозид (авикулярин) [30]. Т.А. Кукушкина с соавт. [27] обнаружили неустановленный гликозид кверцетина, который, по их мнению, является основным компонентом флавоноидного комплекса надземной части. D. Fraisse [32] в качестве основного компонента рассматривает кверцетин-3-арабинопиранозид, тогда как В.М. Баева и С.А. Сасов [33] утверждают, что основной компонент – это рутин, и он составляет 50% и более от суммы флавоноидов. Немногочисленные данные свидетельствуют, что в подземных органах манжетки были найдены катехины и лейкоантоцианы [27, 34, 35]. Кроме флавоноидов, в надземной части манжетки обыкновенной были обнаружены кумарины и фенолкарбоновые кислоты, в спиртовом извлечении присутствовали дубильные вещества [36, 37]. В водном извлечении травы манжетки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) установлено наличие агримонина [12]. В настое травы было определено содержание флавоноидов (рутина, кверцетина, гиперозида, лютеолина), фенолкарбоновых кислот (кофейной, хлорогеновой) и некоторых других фенольных соединений (арбутина, галловой кислоты), витаминов (аскорбиновой кислоты, рибофлавина), а также присутствие азотистых оснований нуклеиновых кислот [38]. Кроме того, в траве и настое манжетки автором было найдено 18 аминокислот, в том числе 7 незаменимых (валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин), установлено содержание некоторых эссенциальных и условно эссенциальных макро- и микроэлементов, а также присутствие ксилозы, глюкозы и галактозы в составе полисахаридного комплекса. В настое определено высокое содержание пролина и оксилизина, а в траве – аспарагиновой и глютаминовой кислот, глицина, валина и лизина. Столь разнообразные сведения о химическом составе манжетки обыкновенной еще раз подчеркивают важность проблемы точной стандартизации лекарственного сырья и фармацевтических форм на его основе, тем более что состав флавоноидов манжетки обыкновенной из различных точек ареала ее распространения различается.

Фармацевтические нормативы

В Германии, Франции, Болгарии и Швейцарии *Alchemilla vulgaris* L. является лекарственным фармакопейным растением [39–41]. В России этот вид не является официнальным, так как отсутствует нормативная документация на лекарственное сырье и методы стандартизации количественной и качественной оценки содержания основных действующих веществ. С середины прошлого века изучение манжетки стало предметом пристального внимания официальной отечественной медицины. И уже в начале нынешнего столетия был разработан проект фармакопейной статьи (ФС) «Alchemillae herba – манжетки трава», регламентирующей качество сырья манжетки на основе *Alchemilla vulgaris* L. как производящего растения для заготовки сырья «Alchemillae herba» [18]. Кроме того, разработан проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП) «Extractum herbae Alchemillae siccum» – «Экстракт травы манжетки сухой» и составлена технологическая схема получения экстракта травы манжетки сухой [18]. Разработаны характеристики подлинности и показатели качества для травы манжетки и нормы качества для настоя травы манжетки [38]. Манжетка обыкновенная рекомендована также в качестве лекарственного растительного сырья, проявляющего гемореологические свойства [37, 42]. Оформлен проект временной фармакопейной статьи (ВФС) в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 [37]. Оценку качества травы манжетки обыкновенной предложено проводить по содержанию флавоноидов в пересчете на цинарозид (лютеолин-7-гликозид) [28, 36]. При изучении взаимосвязи между вариабельностью химического состава БАВ, полифенолов и аминокислот с величиной внутривидовой и внутрипопуляционной изменчивости видов рода манжетка в качестве химических маркеров для стандартизации лекарственного сырья были предложены рутин, гиперозид, галловая и кофейная кислоты, агримонин, пролин и оксилизин. По результатам изучения безопасности настой травы манжетки отнесен к малотоксичным препаратам (пятой категории токсичности) [12]. Не оказывал токсического действия и агримонин (10 г/кг), выделенный из травы манжетки [43].

Из надземной и подземной частей манжетки обыкновенной в лаборатории фитохимии Центрального сибирского ботанического сада Сибирского отделения Российской академии наук (ЦСБС СО РАН) были выделены два биологически активных препарата и получены патенты на способ получения Р-витаминного препарата и способ получения Р-витаминного средства [44, 45]. Показано, что надземная и подземная части растений могут использоваться для получения малотоксичных биологически активных препаратов с высокой Р-витаминной активностью, превышающей таковую у общеизвестного Р-активного препарата «Рутин» [27, 44, 45].

Фармакологическое изучение манжетки обыкновенной

Благодаря широкому спектру биологической активности манжетка обыкновенная является потенциально перспективным объектом изучения официальной медициной. Различные свойства лекарственного сырья манжетки активно изучались сотрудниками ЦСБС СО РАН, Новосибирского государственного медицинского университета и Института клинической и экспериментальной лимфологии [44–47]. В результате исследований, как было указано выше, созданы два препарата с Р-витаминной активностью [44, 45]. Полифенольный препарат из подземных органов манжетки обладает по сравнению с рутином более широким спектром биологического действия на организм и эффективен более чем в четыре раза в 10-кратно меньшей дозе [44]. Биологически активные вещества этого препарата проявляют антигипоксические свойства и уменьшают (в эксперименте) степень некроза при инфаркте миокарда [47, 48]. Препарат из надземных органов манжетки обладает, наряду с капилляроукрепляющими, адаптогенными свойствами в экстремальных условиях (холод) [45]. Хорошая растворимость в воде позволяет расширить область применения препаратов [27, 44, 45]. Многими исследователями манжетка активно изучается в качестве сердечно-сосудистого средства, обладающего лимфотропным, гиполипидемическим, антиишемическим и гемореологическим действием [18, 37, 38, 42, 48, 49]. Полифенольный комплекс из манжетки обыкновенной обладает гораздо большей степенью биологической активности в сравнении с препаратом контроля «Детралекс» [50]. Курсовое введение экстракта манжетки обыкновенной в условиях сердечно-сосудистой патологии (ишемия головного мозга, инфаркт миокарда, артериальная гипертензия) ограничивает процессы деградации эритроцитов, способствует ограничению процессов перекисного окисления липидов и препятствует накоплению продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [37, 51, 52]. В эксперименте экстракт надземной части обладает антиоксидантными свойствами [53]. Выявлена гипогликемическая, иммунокорригирующая активность настоя и сухого экстракта травы манжетки, что позволяет рассматривать ее как сырьё для получения новых антидиабетических средств и иммунокорректоров растительного происхождения [18]. Получены данные об адаптогенном действии полифенолов манжетки и противогипоксическом эффекте при коррекции повреждений (ишемии) печени [49, 54]. Трава манжетки рассматривается также в качестве перспективного растительного сырья для применения в онкологии [38]. Агримонин и сумма полифенолов из травы манжетки снижают общетоксическое действие циклофосфамида, а сумма полифенолов, кроме того, обладает определенной цитотоксической и антитоксической активностью. Настой травы манжетки также обладает противоопухолевой, антиметастатической, цитотоксической и антитоксической активностью [18, 38, 43]. Однако несмотря на столь широкий спектр биологической активности манжетки обыкновенной, сведений о ее противовирусной активности в отношении ВПГ в доступной литературе не обнаружено.

Поиск новых веществ с противовирусной активностью в отношении ВПГ на основе природных соединений растений, относящихся к разным классам химических соединений, по-прежнему актуален. В современной медицинской практике существуют препараты противогерпетического действия (флакозид, алпизарин, хелепин, гипорамин, госсипол и другие), основой для которых послужили вещества полифенольной и флавоноидной природы растений. Богатый химический состав сырья манжетки, основу которого составляют флавоноиды и растительные полифенолы, может служить основанием для исследований противогерпетических свойств растительного сырья этого вида.

Цель наших исследований состояла в изучении токсических и противовирусных свойств экстрактов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), произрастающей в Западной Сибири, в отношении вируса простого герпеса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты

В работе использовали водные растворы высушенного этилацетатного извлечения (экстракта) из корней манжетки обыкновенной (препараты № 5 и № 6) и этанольного извлечения из ее надземной части (препарат № 7), полученные по опубликованным методикам [45]. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) была собрана в фазу бутонизации – начала цветения на Семинском перевале Горного Алтая.

Препараты № 5 и № 6, выделенные из подземных органов манжетки обыкновенной, собранной в разных ценопопуляциях Горного Алтая, представляют собой порошок розоватого цвета, состоящий в основном из

катехинов и лейкоантоцианов (70 %). Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в препарате № 5 идентифицированы (+)–катехин и галловая кислота, а в препарате № 6 – (+)–катехин. В препарате № 6 содержание (+)–катехина больше в 10 раз по сравнению с препаратом № 5.

Препарат № 7 из надземных органов манжетки – это порошок желто-зеленого цвета, состоящий из суммы флавоноидов (71%), из которых идентифицированы рутин, авикулярин, кверцетин, кемпферол и (-)–катехин.

Клетки

Оценку токсических и противовирусных свойств экстрактов проводили в культуре клеток почки взрослой африканской зеленой мартышки (Vero), полученных из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Суспензию клеток с известной концентрацией разводили подогретой до температуры 37 °С средой DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с антибиотиками и 5% эмбриональной сывороткой (HyClone, США) до концентрации 1×10^5 кл./мл и по 100 мкл вносили в лунки 96-луночных планшетов. Планшеты с клетками помещали в термостат на 2–3 сут до образования монослоя при температуре 37 °С, 5% CO_2 и 100% влажности.

Вирусы

В работе использовали вирусы простого герпеса (ВПГ) 1-го (ВПГ-1, штамм VR-3) и 2-го (ВПГ-2, штамм MS) типов, полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (п. Кольцово, Новосибирская обл.). Вирусы нарабатывали в культуре клеток Vero в среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия). Концентрацию вирусов в культуральной жидкости определяли путем титрования образцов в культуре клеток Vero, рассчитывали по методу Спирмена – Кербера, выражали в десятичных логарифмах 50%-х тканевых цитопатических доз в мл (lg $ТЦД_{50}$/мл) и представляли в виде M±m (±l_{95}) для 95%-го доверительного уровня (l_{95}) [55]. Концентрации ВПГ-1 и ВПГ-2 в использованных в работе образцах составляли 5,50±0,30 (0,58) и 3,50±0,24 (0,46) lg $ТЦД_{50}$/мл соответственно. Наработанные и использованные в работе серии вирусов с указанными титрами хранили при температуре минус 70 °С. В качестве поддерживающей при культивировании клеток с ВПГ использовали питательную среду DMEM (ООО «БиолоТ», Россия), содержащую 2% эмбриональной сыворотки.

Определение максимально переносимой и 50 %-й токсической концентрации экстрактов in vitro

При определении токсических доз 10 мг каждого экстракта растворяли в 1 мл среды DMEM, затем разводили в 10 раз (до 1000 мкг/мл) и делали последовательные разведения в 1,2 раза этой же средой (20 концентраций). После этого по 100 мкл разведений экстрактов вносили в соответствующие лунки планшета (по 4 лунки для каждой концентрации) и ставили в термостат на 4 сут при температуре 37 °С, 5% CO_2 и 100% влажности. Через 4 сут с помощью инвертированного микроскопа БИОЛАМ П2-1 (Россия) оценивали деструктивные изменения в монослое клеток Vero, инкубированных с разными концентрациями экстрактов. В качестве контроля использовали монослой культуры клеток Vero без экстрактов. Определяли максимально переносимую концентрацию (МПК), равную концентрации экстракта, не оказывающей на клетки токсического действия ни в одной из лунок, и 50%-ю токсическую концентрацию ($ТС_{50}$ в мкг/мл), равную концентрации вещества в среде, вызывающей разрушение 50% клеточного монослоя в лунках [56, 57], по методу Спирмена – Кербера [55].

Определение 50%-й ингибирующей (эффективной) концентрации экстрактов in vitro

В эксперименте использовали 12 концентраций экстрактов, начиная с МПК для клеток и далее последовательно уменьшая их концентрацию в 1,5 раза (препараты № 5 и № 6) или в 1,3 раза (препарат № 7), и одну множественность заражения 0,01 $ТЦД_{50}$/кл. вируса простого герпеса, вызывающую гибель 100% контрольного клеточного монослоя с вирусом без экстрактов через 4 суток. Сначала на монослой клеток Vero в лунках 96-луночного планшета вносили по 50 мкл различных концентраций экстрактов (по 4 лунки для каждой концентрации) в поддерживающей среде DMEM, а потом вносили по 50 мкл ВПГ-1 (штамм VR-3) или ВПГ-2 (штамм MS) при множественности заражения 0,01 $ТЦД_{50}$/кл. В контрольном клеточном монослое использовали 50 мкл питательной среды без экстрактов и 50 мкл среды, содержащей 0,01 $ТЦД_{50}$/кл. вируса ВПГ-1 или ВПГ-2. Планшеты с клетками культивировали при температуре 37 °С, 5% CO_2 и 100% влажности в течение 4 сут, после чего проводили учет результатов. Через 4 сут с помощью инвертированного микроскопа оценивали повреждение монослоя клеток Vero, культивированных с вирусом без экстрактов или в присутствии разных концентраций экстрактов, и регистрировали количество лунок с поврежденным и неповрежденным (целостным) клеточным монослоем. Затем для каждого экстракта по методу Спирмена – Кербера [55] определяли 50%-ю ингибирующую концентрацию (IC_{50} в мкг/мл), то есть концентрацию вещества в среде, при которой сохраняется 50% клеток в инфицированном монослое [56, 57]. На основании полученных данных рассчитывали индекс селективности (SI) экстракта: SI = $ТС_{50}$ мкг/мл : IC_{50} мкг/мл [57].

Изучение противовирусной активности экстрактов по индексу нейтрализации (ИН) вируса простого герпеса в культуре клеток Vero

В опытах по определению противовирусной активности препаратов из манжетки обыкновенной в отношении вируса простого герпеса готовили 8 десятикратных разведений (с 1-го по 8-е) культуральной вируссодержащей жидкости (КВЖ) каждого типа вируса с использованием поддерживающей среды DMEM (ООО «БиолоТ», Россия).

По 50 мкл разведений вируса вносили в лунки с монослоем клеток Vero (по 6 лунок на каждое разведение вируса). Затем в каждую лунку вносили по 50 мкл исследуемых препаратов в разных концентрациях, при этом концентрация каждого экстракта в среде культивирования клеток не превышала его МПК. В контрольные лунки с инфицированными клетками вносили по 50 мкл поддерживающей питательной среды DMEM. Клетки инкубировали 4 сут при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO_2. Через 4 сут в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали наличие вируса по цитопатическому действию на монослой клеток. На основании этого рассчитывали 50%-е инфицирующие дозы ($ИД_{50}$) вируса *in vitro* (титры вируса) в lg $ТЦД_{50}$/мл в контроле (без препарата) и в опыте (с препаратом) по методу Спирмена – Кербера [55]. Противовирусное действие исследуемых экстрактов оценивали по уменьшению $ИД_{50}$ в опыте по сравнению с контролем. Для этого высчитывали индекс нейтрализации (ИН, в lg) вируса под влиянием препарата: ИН = $ИД_{50}$ контроль – $ИД_{50}$ опыт (lg).

Изучение эффективности действия экстракта на вирус простого герпеса в зависимости от времени его внесения в инфицированную культуру клеток Vero

Для определения эффективности действия растительного экстракта на вирус простого герпеса в зависимости от времени его внесения в инфицированную культуру клеток Vero экстракт № 6 вносили одновременно с инфицированием клеток вирусом в дозе 0,01 $ТЦД_{50}$/кл., а также через 1, 3, 6 и 24 ч после инфекции. Концентрация экстракта в среде культивирования инфицированных клеток была равна МПК. В качестве контроля использовали монослои клеток, в которые вносили питательную среду вместо экстракта в те же временные точки инфекции, что и в опыте. Затем через 72 ч после инфицирования в опытных и контрольных лунках определяли концентрацию вируса путем титрования образцов в культуре клеток Vero и индексы подавления продукции (ИПП) вируса под действием экстракта для каждого времени внесения экстракта.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку и сравнение данных проводили общепринятыми методами для биологических исследований по методу Спирмена – Кербера с оценкой достоверности отличий (p=0,05) для 95% доверительного уровня (I_{95}) [55].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка токсических концентраций экстрактов in vitro

На первом этапе исследований была проведена оценка токсического действия экстрактов, полученных из манжетки обыкновенной, на клеточную культуру Vero. Наибольшие токсические свойства из всех исследованных препаратов проявил образец № 7, полученный из надземной части растения, максимально переносимая концентрация (МПК) которого для этой клеточной культуры составила 30 мкг/мл. По сравнению с этим образцом экстракты, полученные из корней, оказались значительно менее токсичными (МПК для препаратов № 5 и № 6 составили 330 и 280 мкг/мл соответственно).

На клетках Vero были определены также 50%-е токсические концентрации ($ТС_{50}$), 50%-е ингибирующие концентрации (IC_{50}) и индексы селективности (SI) в отношении ВПГ для экстрактов № 5, № 6 и № 7 (таблица 1). Представленные в таблице 1 результаты свидетельствуют о том, что наиболее эффективным, судя по IC_{50} и SI, является этилацетатное извлечение (экстракт) № 6 из корней манжетки обыкновенной.

Результаты исследования подавления инфекционности ($ИД_{50}$) вируса простого герпеса 1-го и 2-го типа в культуре клеток Vero под влиянием препаратов из манжетки обыкновенной при их различных концентрациях в среде культивирования представлены в таблице 2. Было обнаружено, что все препараты, полученные как из корней, так и из надземных органов манжетки обыкновенной, оказывали противовирусный эффект в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2.

Так, индексы нейтрализации ВПГ-1 под действием препаратов № 5, № 6 и № 7 в их максимально переносимых концентрациях для клеток Vero составляли 3,00; 3,00 и 1,67 lg, а ВПГ-2 соответственно – 2,17; 2,50 и 1,17 lg (таблица 2). Как видно из таблицы 2, по данному критерию более выраженный противовирусный эффект проявляли препараты № 5 и № 6, полученные из корней манжетки обыкновенной, по сравнению с полученным из надземных органов растения препаратом № 7, при этом активность препаратов № 5 и № 6 была сравнима.

Современные требования к противовирусным препаратам включают специфичность и эффективность действия при минимальном повреждающем

Таблица 1.

Показатели токсичности и противовирусной активности экстрактов, полученных из различных органов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), в отношении вируса простого герпеса (ВПГ) в культуре клеток Vero

№ экстракта (извлечение)	Орган, из которого получен экстракт	TC_{50} (мкг/мл)	IC_{50} (мкг/мл) в отношении ВПГ		SI = TC_{50} : IC_{50} в отношении ВПГ	
			ВПГ-1	ВПГ-2	ВПГ-1	ВПГ-2
5 (этилацетатное)	Корни	660,69 (645,65–676,08)^	9,55 (9,12–10,00)	19,95 (18,62–21,34)	69,18	33,12
6 (этилацетатное)	Корни	524,81 (512,86–537,03)^	4,79 (4,57–5,01)	8,71 (8,13–9,33)	109,56	60,16
7 (этанольное)	Надземные органы	58,88 (56,23–61,66)^	4,57 (4,36–4,79)	11,48 (10,96–12,02)	12,88	5,12

Примечание: n=4 – число лунок с монослоем клеток при разных концентрациях препарата в среде культивирования; TC_{50} – 50%-я токсическая концентрация, т.е. концентрация препарата, при которой разрушается 50% клеток в неинфицированном монослое; IC_{50} – 50%-я ингибирующая концентрация, т.е. концентрация препарата, при которой сохраняется 50% клеток в инфицированном монослое; SI – индекс селективности препарата; TC_{50} и IC_{50} рассчитаны по методу Спирмена – Кербера; ^ – 95 %-е доверительные интервалы, рассчитанные по методу Спирмена – Кербера.

воздействии на клетки макроорганизма. Известно, что критерием эффективности препарата является высокое значение его химиотерапевтического индекса или индекса селективности (SI), представляющего собой отношение 50%-й токсической концентрации препарата к его 50%-й эффективной концентрации.

В соответствии с этим критерием наиболее эффективным из всех исследованных образцов был препарат № 6, индекс селективности которого составлял 109,56 и 60,16 в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 соответственно (таблица 1).

В дальнейших экспериментах для экстракта № 6, обладающего наиболее выраженным противовирусным эффектом в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2, была исследована эффективность его действия в зависимости от времени его внесения в инфицированную культуру клеток Vero. Для этого растительный экстракт вносили в культуру клеток одновременно с инфицированием клеток вирусом простого герпеса, а также через 1, 3, 6 и 24 ч после инфекции.

Было показано, что достоверное ингибирование продукции ВПГ-1 и ВПГ-2 наблюдалось тогда, когда экстракт № 6 вносили одновременно с заражением клеток вирусами или через 1 ч после заражения (рисунки 3, а и б). Тогда как при добавлении экстракта № 6 манжетки обыкновенной в среду культивирования в период от 3 до 24 ч после инфицирования клеток подавления продукции вируса не происходило (рисунки 3, а и б). Это свидетельствует о том, что экстракт № 6 манжетки обыкновенной оказывает противовирусный эффект в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 на ранних стадиях инфекционного процесса в культуре клеток Vero (адсорбции, проникновения и «раздевания» вируса).

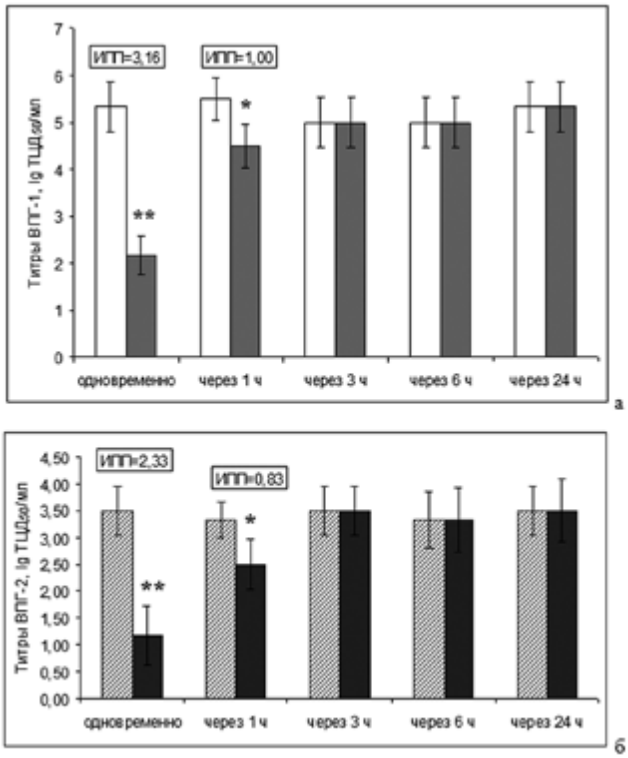


Рисунок 3. Продукция вируса (титры по оси ординат) простого герпеса 1-го (ВПГ-1, а) и 2-го (ВПГ-2, б) типа в контроле и при добавлении экстракта № 6 манжетки обыкновенной (опыт) в разное время после инфицирования культуры клеток Vero (по оси абсцисс).

Обозначения к рисунку:

□ – контроль ВПГ-1,
■ – опыт ВПГ-1,
▨ – контроль ВПГ-2,
■ – опыт ВПГ-2,

ИПП – индекс подавления продукции вируса; * – отличие от контроля при p=0,05, ** – отличие от контроля при p≤0,01

Таблица 2.

Противовирусный эффект экстрактов, полученных из различных органов манжетки обыкновенной, в культуре клеток Vero в отношении вируса простого герпеса (ВПГ)

Тип и штамм ВПГ	№ экстракта	Концентрация экстракта (мкг/мл)	$ИД_{50}$ (в lg $ТЦД_{50}$/мл, M±l_{95}, n=6)	ИН = $ИД_{50}$ контроль – $ИД_{50}$ опыт (lg)
ВПГ 1-го типа (ВПГ-1), штамм VR-3	5	330	2,50±0,46*	3,00
		165	2,50±0,46*	3,00
		80	3,17±0,62*	2,33
		40	3,50±0,62*	2,00
		20	3,83±0,55*	1,67
		10	4,83±0,55	0,67
		5	5,50±0,46	0
	6	280	2,50±0,46*	3,00
		140	2,83±0,55*	2,67
		80	3,50±0,58*	2,00
		40	3,67±0,53*	1,83
		20	3,83±0,55*	1,67
		10	4,50±0,65*	1,00
		5	5,17±0,62	0,33
	7	30	3,83±0,55*	1,67
		20	4,00±0,53*	1,50
		10	4,83±0,55	0,67
		5	5,33±0,53	0,17
Контроль (ВПГ-1)	–	–	5,50±0,58	–
ВПГ 2-го типа (ВПГ-2), штамм MS	5	330	1,33±0,52*	2,17
		165	1,67±0,57*	1,83
		80	2,33±0,57*	1,17
		40	2,50±0,46*	1,00
		20	3,17±0,55	0,33
		10	3,33±0,53	0,17
	6	280	1,00±0,44*	2,50
		140	1,50±0,00*	2,00
		80	2,50±0,00*	1,00
		40	2,67±0,53*	0,83
		20	2,83±0,62	0,67
		10	3,17±0,62	0,33
	7	30	2,33±0,53*	1,17
		20	2,83±0,62	0,67
		10	3,33±0,53	0,17
Контроль (ВПГ-2)	–	–	3,50±0,46	–

Примечание: ИН – индекс нейтрализации; $ИД_{50}$ – 50%-я инфицирующая доза, вычисленная по методу Спирмена – Кербера; M – среднее, l_{95} – 95%-й доверительный уровень; n – число лунок с монослоем клеток, инфицированных разными разведениями вируса; * – достоверное отличие от соответствующего контроля (без экстракта) при p≤0,05.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены сухие экстракты методами этанольного извлечения из надземной части и этилацетатного извлечения из корней воздушно-сухой травы манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), произрастающей в Западной Сибири.

Изучены токсические свойства водных растворов экстрактов манжетки обыкновенной для перевиваемой культуры клеток Vero, определены их максимально переносимые и 50 %-е токсические концентрации.

Показано разными методами, что водные растворы экстрактов манжетки обыкновенной обладают в данной клеточной культуре противовирусным действием в отношении вируса простого герпеса 1-го и 2-го типа.

Показано, что экстракт, полученный из корней растения, оказывал эффективное вирусингибирующее действие на начальных стадиях репродукции обоих штаммов ВПГ в клетках Vero.

Полученные экстракты манжетки обыкновенной перспективны для дальнейшего изучения *in vitro* и *in vivo* с целью создания лекарственных средств, обладающих противовирусным действием в отношении вируса простого герпеса.

ЛИТЕРАТУРА

1. K.J. Looker, A.S. Mag, M.T. May, K.M.E. Turner, P. Vickerman, S.L. Gottlieb, L.M. Newman. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012 // PLOS ONE. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone. 0140765.
2. K.J. Looker, A.S. Mag, M.T. May, K.M.E. Turner, P. Vickerman, S.L. Gottlieb, L.M. Newman. Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012 // PLOS ONE. Published: January 21, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0114989.
3. Вирус простого герпеса // ВОЗ. Информационный бюллетень. 2015. № 400.
4. В.А. Исаков, Е.И. Архипова, Д.В. Исаков. Герпесвирусные инфекции человека. – СПб. 2006. С. 12–150.
5. А.Е. Шульженко, И.Н. Зуйкова. Подходы к иммунотерапии рецидивирующего простого герпеса // Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии. 2010. № 3. С. 10–15.
6. Л.В. Крепкова, В.В. Бортникова, А.А. Шкаренков, Ю.Б. Кузнецов. Токсикологическая оценка нового противовирусного препарата гипорамина // Разработка и внедрение новых методов и средств традиционной медицины. Науч. тр. Т. 2. – М. 2001. С. 191–192.

7. Панавир в лечении вирусных инфекций: монография / Под ред. акад. РАМН проф. В.И. Сергиенко. – М. 2005. 172 с.
8. С.А. Вичканова. Эффективность алпизарина при герпесвирусных заболеваниях у детей и взрослых // Практическая фитотерапия. 2000. № 1. С. 34–39.
9. Н.И. Барам, А.И. Исмаилов, Х.Л. Зияев, К.Ж. Режепов. Биологическая активность госсипола и его производных // Химия природн. соедин. 2004. № 3. С. 171—176.
10. С.А. Вичканова. Клинические исследования хелепина – противовирусного средства из травы *Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag. // Химия, технология, медицина: Сб. науч. трудов, посвящ. 75-летию Всерос. н.-и. института лекар. и аром. растений. – М. 2006. С. 480–484.
11. В.В. Бортникова. Сравнительная токсикологическая характеристика и новые фармакологические свойства антимикробных и противовирусных препаратов растительного происхождения: автореф. дисс. ... к.биол.н. – Купава. 1988. 23 с.
12. В.М. Баева. Фармакогностическое изучение лекарственных растений с использованием молекулярно-биологических методов: автореф. дисс. ... д.фарм.н. – М. 2009. 48 с.
13. К.П. Глазунова. Апомиксис у восточноевропейских представителей рода *Alchemilla* L.: автореф. дисс. .... к.биол.н. – М. 1983. 24 с.
14. С.К. Черепанов. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). Русское издание. – СПб.: Мир и семья, 1995. 992 с.
15. Флора Центральной Сибири. II Розоцветные – Астровые / Под ред. Л.И. Малышева и Г.А. Пешковой. – Новосибирск: Изд-во «Наука» Сибирское отделение, 1979. 1047 с.
16. И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 2. – М. 2003. 665 с.
17. О.В. Жукова. Популяционное исследование микровидов манжетки *Alchemilla vulgaris* L.s.l., Rosaceae: автореф. дис. ... к.биол.н. – Йошкар-Ола. 2008. 24 с.
18. Е.В. Зорина**.** Фармакогностическое изучение видов рода *Alchemilla* L. Пермского края: автореф. дис. ... к.биол.н. – Пермь. 2009. 24 с.
19. Флора Восточной Европы. Т.Х. Покрытосеменные. Двудольные / Под ред. Цвелева Н.Н. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии, 2001. 670 с.
20. Биология. Большой энциклопедический словарь / Гл. ред. М. Гиляров – М.: Большая Российская энциклопедия, 2001. 864 с.
21. М.Г. Попов. Флора Средней Сибири. Т. 1. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1957. 554 с.
22. Определитель растений Алтайского края / Отв. ред. д.б.н., проф. Краснoборов И.М. – Н-ск. 2003. 634 с.
23. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Т. 3. Семейства Hydrangeaceae-Haloragaceae. – Л.: Наука, 1987. 326 с.
24. М.А. Носаль, И.М. Носаль. Лекарственные растения и способы их применения в народе. – Киев. 1959. 256 с.
25. Д. Йорданов, П. Николов, Асп. Бойчинов. Фитотерапия. 1970. – София. С. 91.
26. А. Брем. Жизнь растений. – М.: ЭКСМО, 2007.
27. Т.А. Кукушкина, А.А. Зыков, Л.А. Обухова. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) как источник лекарственных средств // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы IIY Межд. съезда. Фитофарм. С-Петербург. 2003. С. 64–69.
28. Ж.С. Лесовая, Д.М. Писарев, О.О. Новиков, Т.А. Романова. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.s.l. // Научные ведомости Белгородского университета. Сер. Медицина. Фармация. 2010. № 22 (93). Вып. 12/2. С. 145–149.
29. K. Fuchs. Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Prunus spinosa L. und einiger Rosaceenarten. Dissertation. – Munchen. 1959.
30. M. D"Agostino, L. Dini, E. Ramundo and F. Senatore. Flavonoid glycosides of Alchemilla vulgaris L. // Phytother. Res. 1998. № 12. P. 162–163.
31. В.А. Бандюкова. Распространение флавоноидов в некоторых семействах высших растений // Растит. рес. 1969. Т. 5. Вып. 4. С. 490–600.
32. D. Fraisse, A. Heitz, A. Carnat, A.P. Carnat, J.L. Lamaison. Quercetin 3-arabinipyranoside, a major flavonoid compound from Alchemilla xanthochlora // Fitoterapia. 2000. V. 71. № 4. P. 463–464.
33. В.М. Баева, С.А. Сасов. Современные аспекты изучения лекарственных растений // Научные труды. Т. XXXIV. – М. 1995. С. 242–244.
34. С.В. Теслов, Л.С. Макарова. О катехинах некоторых розоцветных Пермской области // Научные труды Пермск. фармац. ин-та. 1969. С. 217–223.

35. L. Tuka, H. Popesku. Determination of tannins in the plants of Alchemilla mollis (Buser) Rothm. and A. vulgaris L. // Clujul med. 1979. Vol. 52. № 1. P. 78–83.

36. В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина. Исследование химического состава надземной части манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.s.l.// Химия растит. сырья. 2000. № 2. С. 79–85.

37. В.Ю. Андреева. Влияние экстракта манжетки обыкновенной на морфофункциональные свойства эритроцитов при сердечно-сосудистой патологии: автореф. дис. ... к.биол.н. – Томск. 2001. 24 с.

38. И.И. Мурин. Фитохимическое и фармакологическое изучение травы манжетки: автореф. дис. ... к.фарм.н. – М. 2011. 24 с.

39. Pharmacopee Francaise. IX Edition. 5-e suppl. –Juillet. 1979.

40. F.Ch. Czgan, D. Frohne, Ch. Holtzel. Teedrogen und Phytopharmaka – Stuttgart. 1997. 668 p.

41. European Pharmacopeia. 2008. Monograph S. 1387.

42. М.Б. Плотников, А.А. Колтунов, О.И. Алиев, Г.И. Калинкина, Т.П. Березовская. Действие экстракта *Alchemilla vulgaris* L. на реологические свойства крови при экспериментальном инфаркте миокарда // Тр. 1-ой Всерос. конф. по ботаническому ресурсоведению. – СПб. 1996. С. 221.

43. Патент RU 2429852. A61P35 – Противоопухолевые средства; A61K31/70 – Углеводы; сахара; их производные (сорбит A61K 31/047) / С.А. Сасов, В.М. Баева, И.И. 2011.

44. Авт. свид. № 1073966. Способ получения Р-витаминного препарата / Г.Р. Азовцев, Е.Г. Изюмов, А.А. Зыков. 1983.

45. Патент РФ № 2128516. Способ получения Р-витаминного средства / Т.А. Кукушкина, Т.А. Жанаева, А.А Зыков, Л.А. Обухова, В.Г. Селятитская. 1999.

46. Ю.И. Бородин, В.Г. Селятитская, Л.А. Обухова, Н.А. Пальчикова, С.В. Одинцов, Т.А. Кукушкина. Влияние полифенольных соединений манжетки обыкновенной на морфофункциональное состояние щитовидной железы крыс при действии низких температур // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999. Т. 127. № 6. С. 697–699.

47. Ю.И. Бородин, В.А. Головнев, А.Б. Гончаров, А.А. Зыков, А.Д. Тюлюбаев. Сравнительная характеристика клеточного состава регионарных лимфатических узлов сердца при повторном экспериментальном метаболическом инфаркте миокарда в условиях его коррекции биофлавоноидами манжетки обыкновенной // Бюллетень СО РАМН. 2003. № 2 (108). С. 73–80.

48. А.А. Зыков, В.А. Головнев, О.М. Белкина. Изменение жирнокислотного состава крови и лимфы на фоне действия биофлавоноидами манжетки обыкновенной при инфаркте миокарда // Бюллетень Сибирского отделения АМН СССР. 2000. № 1. С. 63–64.

49. А.Р. Шевцов. Морфологические преобразования в селезенке крысы при синдроме длительного сдавления и в условиях коррекции биофлавоноидами манжетки обыкновенной: автореф. дис. ... к.мед.н. – Новосибирск. 2008. 24 с.

50. А.Б. Гончаров. Патоморфологические изменения в регионарных лимфатических узлах сердца при повторном метаболическом инфаркте миокарда и при его коррекции биофлавоноидами в эксперименте: автореф. дис. ... к.мед.н. – Новосибирск. 2002. 24 с.

51. С.Я. Жанаева. Изменения лизосом печени крыс при интоксикации гербицидом 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой и коррекции полифенольным комплексом из листьев манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.): автореф. дис. ... к.биол.н. – Новосибирск. 2000. 24 с.

О.И. Алиев. Фармакологическая коррекция синдрома повышенной вязкости крови при сердечно-сосудистой патологии:автореф. дис. ... к.мед.н. – Томск. 2004. 48 с.

53. O. Oktyabrsky, G. Vysochina, N. Muzyka, Z. Samoilova, T. Kukushkina, G. Smirnova. Assesment of antioxidant acrivity of plant extracts using microbial test systems // Journal of Applied Microbiology. 2009. V. 106. P. 1175–1183.

54. Е.С. Лукьянова. Морфофункциональные изменения печени и почек в различные периоды синдрома длительного сдавления и на фоне применения ксенобиотиков: автореф. дисс. ... д.мед.н. – Новосибирск. 2006. 48 с.

55. Л. Закс. Статистическое оценивание. – М.: Статистика, 1976. 598 с.

56. Virology Methods Manual / Ed. by: Brian W.J. Mahy and Hillar O. – Kangro: Academic Press, 1996. 374 p.

57. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Хабриева Р.У. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. 832 с.

УДК 615.322

ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ КОМПОЗИЦИЯМИ БЕРЕЗОВОГО ГРИБА ЧАГА

О.Ю. Кузнецова[1]*

1 – ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВПО «КНИТУ»), 420015, Россия, г. Казань, ул. К. Маркса, 68

1 – Federal State Educational Institution of Higher Professional Education Kazan National Research Technological University ("KNRTU"), 68, K. Marx str., Kazan, 420015, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: kuznetsovaolga@mail.ru
Тел.: 8 (843) 231 95 71

Резюме. Проведен обзор современной продукции с биологически активными композициями березового гриба чага. Выявлен высокий интерес к чаге как к перспективному лекарственному природному сырью. Рассмотрены традиционные и инновационные препараты, в состав которых входит чага в той или иной степени и форме.

Ключевые слова: биологически активные композиции, экстракты, фитопрепараты, космецевтические средства, БАД, пищевые продукты и напитки функционального назначения.

REVIEW OF MODERN ADVANCED MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS OF CHAGA MUSHROOM BIRCH

O.Yu. Kuznetsova[1]*

Abstract. Advanced products containing the biologically active components of chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) have been reviewed. A great interest in chaga as a promising natural crude drug has been found. Conventional and innovative medicinal products containing chaga in any forms and amounts have been considered.

Keywords: chaga, biologically active compositions, extracts, herbal, cosmeceutical, dietary supplements, foods and beverages of a functional purpose.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности актуальной является разработка продукции из природного сырья, что обусловлено широким спектром его биологического действия. По мнению многих исследователей, экономический эффект от использования отечественных препаратов природного происхождения выше, чем от создания синтезированных препаратов [1–4].

В данной работе приведен обзор современных лекарственных препаратов и биологически активных добавок (БАД), косметических средств и продуктов питания функционального назначения, в состав которых в той или иной форме входят действующие вещества березового гриба чага. Проанализировано более 50 продуктов с чагой, встречающихся в свободной продаже на российском рынке. Период исследования составил 6 лет – с 2010 по 2015 гг.

Березовый гриб чага [*Inonotus obliquus* (Pers.) Pil.] применяют как общеукрепляющее и противовоспалительное средство. Он используется при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта язвенной этиологии, а также для устранения симптомов при опухолях различной локализации, способствует повышению защитных сил организма, влияя на процессы обмена веществ, способствует мобилизации угнетенных под влиянием заболеваний защитных механизмов [2, 3, 5–8].

Трутовый гриб чага или его действующие биологически активные вещества нашли широкое применение в фито- и фунготерапии, поскольку они довольно часто используются в практике лечения онкологических заболеваний разной степени сложности [2–19].

Препараты на основе чаги имеют широкий спектр биологической активности. Они обладают высокими антитоксическими, радиопротекторными, иммуномодулирующими, генопротекторными, адаптогенными, антивирусными, антиоксидантными свойствами, регулируют активность ферментов крови, а также деятельность сердечной, нервной и дыхательной систем живого организма [2, 3, 5–19].

В последнее время чага преимущественно экспортируется в восточные страны, например в Японию, Корею, Китай и др. Затем импортируется в Россию в виде различных лекарственных препаратов и БАД на её основе [20]. Детальных исследований по компонентам, обеспечивающим физиологическую и терапевтическую активность экстрактов чаги, лекарственных форм, косметических средств и БАД,

ввозимых в страну, как правило, не проводится (в основном проверки осуществляются только по стандартным методикам, прописанным в Государственной фармакопее [31]).

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЧАГИ

Области применения чаги в различных отраслях промышленности и их взаимосвязь схематически приведены на рисунке 1.



Рисунок 1. Области применения чаги

В фармации и медицине чага используется в первую очередь в качестве лекарственного сырья и галеновых препаратов, а также в составе трансдермальных терапевтических систем (ТТС), таблетированных форм и БАД (рисунок 2) [21].



Рисунок 2. Применение чаги в медицине и фармации

БАД с чагой представлены в виде драже, капсул, таблеток, экстрактов и других, удобных для приема формах. Они являются хорошими вспомогательными средствами в дополнение к традиционным продуктам питания, способствуют быстрой ликвидации практически любого дефицита витаминов и микроэлементов [21].

В косметической промышленности чага используется в составе таких косметических средств, как кремы, гели, лосьоны, шампуни, мыла и др. [21–22]. Как правило, это космецевтические средства – косметические препараты с многофункциональными натуральными ингредиентами [22].

В пищевой промышленности использование чаги встречается в производстве безалкогольных напитков (сиропы, прохладительные напитки, чаи, напитки для лечебно-профилактического питания), ликеро-водочной продукции (бальзамы, настойки), пищевых продуктов функционального назначения (медовые композиции с чагой, желейные мармелады, майонезы и майонезные соусы и др.) [20, 21, 23–30].

Надо отметить, что приведенное здесь деление препаратов чаги достаточно условное, поскольку один и тот же препарат с равным успехом можно отнести как к фармации (если препараты зарегистрированы и рекомендованы к медицинскому применению в качестве лекарственных средств), так и к косметологии (если нет подобной регистрации), например гели, кремы и т.п.; а производство БАД основано на современных подходах в фармацевтической и пищевой промышленности.

Наиболее популярными и широко используемыми препаратами на основе чаги являются сырье гриба чага, галеновые препараты «Бефунгин» и «Настойка чаги». Это современные лекарственные средства по профилактике и коррекции свободнорадикальных патологий. Они широко представлены на современном фармацевтическом рынке России и традиционно используются в лечебной практике как народной, так и официнальной медицины.

«Сырье чага измельченное» [*Inonotus obliquus* (Pers.) Pil, сем. гименохетовых – Hymenochaetaceae] – наросты бесплодной формы трутовика косого – чаги (березового гриба). Сырье реализуется через аптечную сеть, проходит обязательную процедуру стандартизации и сертификации, радиационный контроль осуществляется по СанПиН 2.3.2.560-96 и СанПиН 2.3.2.1078-01 [8, 31]. Выпускается, как правило, в пакетах бумажных типа II или полиэтиленовых вместимостью 50, 100 или 200 г с последующим вложением в картонные пачки. Наиболее частые поставщики-производители: ООО «Травы Башкирии» (Уфа), АОА «Красногорсклексредства» (Красногорский район, МО), Фирма «Здоровье» (Москва), реже ОАО «Татхимфармпрепараты» (Казань), ЗАО ООО «АПЕКС» (Санкт-Петербург), ЗАО «ТЕХМЕД-СЕРВИС» (Москва), ЗАО «АРНИКА» (Санкт-Петербург), АО «АДОНИС» (Санкт-Петербург), ООО «ФАРОС-21» (Краснодар) [8].

Сырье чаги применяется в следующих случаях: хронические гастриты, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки вне обострения, дискинезии желудочно-кишечного тракта по гипокинетическому типу, а также при онкологических заболеваниях в качестве симптоматического средства, улучшающего общее состояние онкологических больных.

Согласно фармакопейной статье на лекарственное растительное сырье чагу, приведенной в ГФ XI [8, 31], к плодовым телам чаги предъявляют следующие требования. Сырье представляет собой темно-коричневого цвета кусочки без запаха, слегка горьковатые на вкус, размером не более 7 мм. Оценка качества сырья ведется по следующим показателям: содержание хромогенного комплекса (чаговой кислоты, меланина или полифенолоксикарбонового комплекса) – не менее 10%; влажность – не более 14%; золы общей – не более 14%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, – не более 4%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,2 мм, – не более 18%. Срок годности составляет до 2 лет.

В народной медицине известно много рецептов приготовления настоев из плодовых тел чаги в домашних условиях. Некоторые из них приведены ниже.

Способ применения 1. Гриб моют холодной водой, замачивают в кипяченой воде, чтобы тело гриба полностью было погружено в воду, и настаивают 4–5 ч (свежий гриб можно и не замачивать). После этого сырье измельчают на терке либо пропускают через мясорубку. Воду, в которой замачивался гриб, используют для настоя. Одну часть измельченного гриба заливают 5 частями (по объему) подогретой до 50 °С воды, оставшейся после замачивания. Настаивают 2 суток, воду сливают, осадок отжимают через несколько слоев марли. Полученную после этого густую жидкость разбавляют водой до первоначального объема. Приготовленный настой можно хранить 2–4 дня. При опухолях назначают взрослым не менее 3 стаканов в течение суток дробными порциями [2].

Способ применения 2. Измельченное сырье заливают горячей водой (60–70 °С) в термосе дробно. Первая заливка осуществляется из расчета 300 мл воды на 50 г сырья. После пятичасового настаивания с периодическим легким встряхиванием термоса получается около 150 мл отжатого теплого сока (экстракта). Для дальнейшего извлечения экстрактивных веществ остающийся жом заливают повторно 200 мл воды (60–70 °С) и настаивают в течение 5 ч. После указанного времени сок (экстракт) сливают, отжимая также и жом, который далее не используется. Порции объединяют. Полученного настоя достаточно на 6–7 дней. Суточная лечебно-профилактическая доза составляют 3–4 столовых ложки настоя. Хранить настой рекомендуется в темном и прохладном месте [8, 32].

Способ применения 3. Гриб заливают горячей водой (в соотношении 1:4) и оставляют на некоторое время. Затем влажный гриб измельчают и к измельченной массе добавляют 5 частей горячей воды. Настаивание ведут в течение 2 дней. Верхний слой воды сливают, а осадок отжимают. Принимают по 50–100 мл 3–4 раза в день [8].

Способ применения 4. Свежий гриб промывают, трут на терке. Сушеный гриб предварительно замачивают на 15 мин в холодной воде. На 1 часть гриба берут 5 частей кипяченой воды с температурой не выше 50 °С. Настаивают 2 суток, затем процеживают и отжимают осадок в настой. Принимают по 3 стакана в день за полчаса до еды. Настой хранят в холодном месте не более 4 суток [8, 33].

Способ применения 5. На 1 стакан измельченной в порошок чаги берут 5 стаканов горячей, но не кипяченой воды. Смесь прогревают в водяной бане 4 ч, так чтобы вода в бане кипела, а смесь – нет. Принимать перед едой по 1 столовой ложке 3 раза в день [8, 33].

Способ применения 6. Гриб заливают водой, настаивают 4 ч, затем трут на мелкой терке или пропускают через мясорубку. Воду, в которой размачивают гриб, сохраняют. На 1 часть гриба чага берут 5 частей теплой кипяченой воды и настаивают 2 суток. Жидкость сливают, отжимают туда осадок. Добавляют воду, оставшуюся после размачивания гриба. Принимают по 1 столовой ложке 3 раза в день перед едой. Хранят в холодном месте не более 5 дней [8, 33].

Способ применения 7. Рецепт чая из чаги. Кусок чаги размером с грецкий орех кладут в чайник, заливают некрутым кипятком и настаивают 10 мин, после чего настой готов к употреблению [8].

Настой чаги не токсичен, но его ограничивают при заболеваниях, сопровождающихся задержкой жидкости в организме. В этих случаях настой гриба можно употреблять взамен чая и других напитков или же применять настой двойной крепости (2 объемные части гриба на 5 частей воды) [8].

В целом надо отметить, что все рассмотренные способы не сильно отличаются друг от друга, хотя есть ряд нюансов.

«Бефунгин». Препарат «Бефунгин» введен в современную фармацию в 50–60-х годах XIX века. За это время он уже успел зарекомендовать себя как достаточно эффективный лекарственный препарат. Традиционно его используют при лечении онкологических заболеваний. «Бефунгин» повышает защитные силы организма, действует как общеукрепляющее, анальгезирующее, общетонизирующее средство; регулирует метаболические процессы, нормализует пищеварение.

«Бефунгин» показан при лечении запущенных форм рака IV стадии в качестве симптоматического средства, улучшающего общее состояние онкологических больных. Его применяют при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта: хронических гастритах, язвенной болезни желудка и двенадцати-

перстной кишки. Кроме того, его используют в комплексном лечении псориаза, а также как общетонизирующее и болеутоляющее средство.

Технология получения препарата «Бефунгин» заключается в последовательной экстракции чаги водой в батарее экстракторов [8, 34–35] с последующим упариванием полученных диффузионных соков (водных извлечений или экстрактов чаги). По технологическому регламенту в полученные диффузионные соки добавляют этанол и соли кобальта (кобальта сульфат и/или кобальта хлорид).

В состав препарата входят: чага измельченная – 1000 г, кобальта хлорид 6-водный – 1,7511 г, спирт этиловый 95 % (этанол) – 100 г, вода очищенная –до 1 л. Препарат выпускается в виде полугустого экстракта во флаконах по 100 мл.

Международное непатентованное наименование препарата «Бефунгин» – «Чаги экстракт + Кобальта хлорид» либо «Чаги экстракт + Кобальта сульфат + Кобальта хлорид» («Fungi betulini extract + Cobalt sulfate + Cobalt chloride») [8, 35–38].

Согласно литературным данным [36] на сегодняшний день в России в промышленном масштабе этот препарат производят следующие предприятия: ОАО «Татхимфармпрепараты» (Россия), ЗАО «Вифитех» (Россия, МО), Ярославская фармацевтическая фабрика (Россия), ОАО «Марбиофарм» (Россия), ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм» (Россия), Тверская фармацевтическая фабрика (Россия). Однако наблюдение за фармацевтическим рынком на протяжении более десяти лет показало, что в аптечной сети на всей территории России присутствует с равным успехом продукция только первых двух предприятий-производителей [35].

Способ применения: внутрь за 30 мин до еды; перед употреблением содержимое флакона взбалтывают, разводят 3 чайных ложки препарата в 150 мл теплой кипяченой воды. Принимают по 1 столовой ложке 3 раза в день в течение 3–5 месяцев. При необходимости курсы лечения повторяют с перерывами в 7–10 дней.

Противопоказания: гиперчувствительность. Возможны аллергические реакции. Нельзя использовать «Бефунгин» одновременно с антибиотиками, глюкозой, сахаром и медом.

«Настойка чаги» используется в качестве симптоматического средства, улучшающего общее состояние онкологических больных [35]. Технология получения препарата «Настойка чаги» включает двухчасовое кипячение чаги в 70% этиловом спирте в экстракторе [3, 8, 35, 36, 39]. «Настойка чаги» представляет собой жидкость коричневого цвета, которую принимают внутрь по 20–30 капель за 30 мин до еды 3 раза в день. Выпускается во флаконах по 50 или 100 мл. Производители: ОАО «Московская фармацевтическая фабрика» (Москва, Россия), ООО «Фитофарм-НН» (Нижний Новгород, Россия).

Далее рассмотрим другие лекарственные формы готовых фармацевтических препаратов с биологически активными композициями чаги: порошкообразные или таблетированные формы (сухие экстракты, очищенные меланины), мягкие лекарственные формы (мази, кремы, фитокапсулы), трансдермальные терапевтические системы (фитопленки, пластыри).

«Сухой экстракт». В НИИ фармакологии научного центра Томского государственного университета им. В.В. Куйбышева Г.Л. Рыжовой с соавторами [40, 41] был разработан способ получения лекарственного средства, обладающего противоязвенной и адаптогенной активностью. Экстрагирование березового гриба чага проводили водой при повышенной температуре в две стадии с помощью ультразвука частотой 20–55 кГц, интенсивностью 0,1–2,3 Вт/см^2, при 60–65 ^{o}C в течение 50–60 мин при соотношении сырье – экстрагент 1:10–1:15 (модуль 0,1–0,15) на каждой стадии. В дальнейшем экстракты отделяют от шрота, объединяют и высушивают из тонкой пленки. Авторами изучен состав нового препарата и проведены эксперименты по его физиологическому действию на организм [40]. Однако данный препарат пока не представлен на фармацевтическом рынке России.

В течение всей жизни люди пользуются мягкими лекарственными формами (МЛФ) медицинского назначения для профилактики и лечения различных заболеваний в дерматологии при наружной терапии повреждений кожи разной этиологии, в гинекологии, проктологии, офтальмологии; а также косметическими средствами, чтобы защитить кожу от вредных воздействий и продлить ее красоту и молодость. В зависимости от консистенции, степени вязкости и упругости к мягким лекарственным формам относят мази, кремы, гели, пластыри, мягкие желатиновые капсулы и др. Основная их особенность: используются для местного применения путем нанесения на кожные покровы и слизистые оболочки [34, 36–37].

Мягкие лекарственные формы с биологически активными композициями чаги представлены в первую очередь разнообразными кремами и мазями [20, 21].

Особое внимание обращает на себя уже хорошо узнаваемый бренд фирмы ООО «Фора-Фарм» – крем-бальзам «Чага». В этой серии выпускается ряд препаратов, отличающихся незначительно составом и частично показаниями к применению.

«Крем-бальзам «Чага» для тела при заболевании суставов». В своем составе содержит экстракт чаги, масло облепиховое, масло кедровое; масляные

экстракты различных лекарственных растений (сабельника, зверобоя, можжевельника, золотого корня, гинкго билоба, шиповника, девясила, женьшеня); глицерин, гидролизат коллагена, Д-пантенол, ланолин, витанол, витамины А и Е, кемабен, катон, воду, обогащённую ионами серебра; воск пчелиный и др. Выпускается в пластиковых тубах по 75 мл. Рекомендуется для предотвращения развития воспалительного процесса, помогает снимать боль и восстанавливать подвижность суставов, препятствует разрушению хрящевой ткани, способствует восстановлению суставной (синовиальной) жидкости, снимает мышечный спазм, улучшает обмен веществ, активизирует кровообращение, стимулирует выведение токсинов и солевых отложений из суставов, ускоряет заживление повреждённых тканей.

«Крем-бальзам «Чага» для ног при заболеваниях вен». Состав тот же с незначительными отличиями компонентов в смеси из масла кедрового, масляных экстрактов зверобоя, можжевельника, золотого корня, гинкго билоба, шиповника, девясила, женьшеня; заменен на масла зародышей пшеницы, масляные экстракты каштана конского, сабельника, софоры японской, зелёного чая, морозника, крапивы, шалфея. Выпускается в пластиковых тубах по 75 мл. Показан в качестве средства, повышающего тонус стенок сосудов, уменьшающего боль, чувство тяжести и распирания в ногах, снимающего отёки, предупреждает появление сосудистых сеточек и звёздочек. Эффективно смягчает и увлажняет кожу. Облегчает проведение сеансов массажа. Препятствует появлению трофических язв.

«Бальзам В. Дикуля». Состоит из медвежьего и барсучьего жира, мумиё, экстракта чаги, воска пчелиного, прополиса, масел облепихового, кедрового, оливкового, льняного; экстрактов сабельника, золотого корня, ромашки, зверобоя, красного перца, эвкалипта; гидролизата коллагена, Д-пантенола и консервантов. Выпускается в пластиковых тубах по 75 мл. Используется при профилактике обострений и комплексном лечении остеохондроза, радикулита, подагры, артритов и других суставных заболеваний, показан при миозитах и невралгиях.

Фирмой «Стрелец» (Россия) выпускается следующая по популярности серия МЛФ с биологически активными композициями чаги. Рассфасовка продукции осуществляется в пластиковые тубы по 75 мл.

«Бефунгин», бальзам для тела». В состав входит экстракт березового гриба (чаги), оливковое масло, масло зародышей пшеницы, рисовое масло, витаминный комплекс. Экстракт березового гриба (чаги) оказывает регенеративное и противовоспалительное действие, улучшает обменные процессы в клетках кожи, укрепляет стенки кровеносных сосудов, стимулирует заживление повреждений кожного покрова (порезы, трещины, ожоги и т.д.), ускоряет рассасывание синяков и гематом. Оливковое масло и масло зародышей пшеницы обладают высокой антиоксидантной активностью, эффективно смягчают и защищают кожу. Рисовое масло обеспечивает упругость и глубокое увлажнение. Витаминный комплекс снижает сухость и шелушение кожи. Бальзам рекомендуют для восстановления кожного покрова, его питания и увлажнения, поддержания тонуса.

«Бефунгин», биокрем для ног». В состав входит экстракт березового гриба (чаги), экстракт конского каштана, натуральные растительные масла, витаминный комплекс. Регулярное применение крема способствует улучшению кровотока нижних конечностей, уменьшению проницаемости и ломкости капилляров, снимает усталость и отечность ног, освежает, тонизирует. Экстракты чаги и конского каштана способствуют укреплению стенок кровеносных сосудов, повышению их эластичности, активизации регенеративных процессов в клетках кожи, препятствуют образованию сосудистых сеточек и звездочек. Входящие в состав биокрема натуральные растительные масла и витаминный комплекс устраняют сухость и шелушение кожи ног, питают и смягчают.

Ряд фармпроизводителей России и стран СНГ (НПО «Оздоровительные биотехнологии», «ФЛОРА-SI», «Эликсир», «АПТЕКА ПРИРОДЫ», ООО «Чаровница» и др.) имеют в своей линейке продукции также МЛС с биологически активными композициями чаги, которые представлены следующими препаратами: бальзамы «Золотой ус» с муравьиным спиртом, «Лесной лекарь»; кремы-бальзамы «Чага» для ран, «Золотая чага – Микотон», «Живительный» с экстрактом чаги; гель-бальзам «Доктор чага», мазь для наружного применения «Меланин», тонизирующий крем-гель для шеи и бюста «Чаровница» и ряд других [8, 20, 21]. Подобные препараты в основном обладают противовоспалительным, восстанавливающим, омолаживающим, противоотечным эффектами, заживляют раны, ожоги и обморожения. Например, ***тонизирующий крем-гель для шеи и бюста «Чаровница»*** (ООО «Чаровница») рекомендован для повышения эластичности и тонуса кожи шеи и бюста. Состоит из гиалуроновой кислоты, витаминов РР и Е, лейкоцитарного экстракта, ферментарного экстракта винограда, экстрактов чаги, алоэ, зеленого чая, ламинарии, сои, шалфея, лимона, женьшеня, календулы, ромашки. Выпускается в пластиковых тубах по 200 мл.

Фирмами ООО «Фитасинтекс», ООО «Иммуносфера», ЗАО «Целебная Амфора» выпускается масляный экстракт гриба чага ***«Масло чаги»*** (в пластиковых пузырьках по 75 мл) [42], который может использоваться для улучшения микро- и макроциркуляции крови, эф-

фективен при артритах, для уменьшения нагрузки на вены (вечерние отеки).

Следующими МЛФ для наружного применения, способными прилипать к коже, являются трансдермальные терапевтические системы (ТТС) или, как их еще называют, аппликационные лекарственные средства (АПЛС). К ним относятся пластыри, плёнки (в том числе фитопленки), пластины, диски, маски для лица и тела и т.п. [43]. ТТС обладают значительными преимуществами по сравнению с традиционными средствами аппликационной терапии (растворами, гелями, мазями). Они обеспечивают контролируемое поступление лекарственных веществ в течение длительного времени непосредственно в очаг поражения. При использовании ТТС лекарственное вещество диффундирует из лекарственного препарата на поверхность кожи, затем препарат проходит сквозь роговой слой и достигает эпидермиса, а потом и дермы, где васкулярная сеть переносит его частицы к заболевшим органам [44].

Известны разработки и исследования следующих АПЛС с биологически активными композициями чаги. Т.П. Зюбр и др. [45] разработали технологию создания стоматологических фитопленок на основе сухого экстракта чаги при лечении инфекционных воспалительных заболеваний слизистых оболочек полости рта. О.Ю. Кузнецовой и др. [22, 46–48] разработаны АПЛС с биологически активными композициями чаги в виде фитопленок (ФП). В качестве биологически активного компонента использовался оригинальный экстракт чаги серии Фунги Б11 [49], который характеризуется хорошими противовоспалительным, антиоксидантным и ранозаживляющим эффектами. Он рекомендован при обработке кожных покровов после ожогов, обморожений.

Данные разработки пока отсутствуют в свободной продаже, что связано с длительным процессом выхода лекарственных препаратов на рынок, поскольку необходимы многочисленные доклинические и клинические испытания.

Еще одной дозированной МЛФ являются мягкие желатиновые капсулы. В этих МЛФ лекарственное средство заключено в желатиновую оболочку, которая растворяется при приеме перорально в определенном участке желудочно-кишечного тракта.

Фитокапсулы с биологически активными композициями чаги представлены такими препаратами, как «Чаговит» (ЗАО «ГНЦ ПМ ФАРМА», ОАО «ЭДАС»), «Экстракт чаги с витамином С» (ЗАО «Московская фармацевтическая фабрика»). Основу этих препаратов составляет мелко измельченный порошок чаги в желатиновых капсулах. Фитокапсулы рекомендуются в комплексной терапии онкологических больных в качестве биологически активных добавок к пище, как дополнительный источник аскорбиновой кислоты и полифенолов. Основное действие общеукрепляющее и детоксицирующее, снижают риск развития сезонных простудных заболеваний. Используются для коррекции иммунного статуса организма и нормализации обмена веществ.

Препараты чаги нового поколения ***«Чаговит»*** (измельченный порошок чаги в капсулах) и ***«Чагалюкс»*** (оригинальный нетоксичный препарат на основе фитокомпозиций нового поколения) разработаны в ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина. Результаты многочисленных исследований по разработке препаратов лечебно-профилактического назначения «Чаговит» и «Чагалюкс» подробно описаны в работах М.Я. Шашкиной и соавторов [6, 7, 50]. Эти препараты рекомендованы к использованию как в профилактике первичных заболеваний, так и в составе комплексной или комбинированной терапии при лечении онкологических, предопухолевых и хронических заболеваний, в том числе сахарного диабета II типа, рака желудка IV стадии, пищевода, кишечника, бронхо-легочной системы, грудной клетки, лимфолейкоза.

Фитокапсулы «Чаговит» и «Чагалюкс» предназначаются для различных категорий и возрастных групп населения. Здоровым людям рекомендуются для снижения риска развития наиболее распространенных заболеваний, в том числе онкологических, коррекции и нормализации физиологических функций организма, нарушенных из-за дефицита витаминов, антиоксидантов, вредных факторов среды, для снятия усталости, повышения работоспособности и хорошего настроения. Больным – в качестве симптоматического вспомогательного средства для повышения эффективности лечения патологий (онкологических, сердечно-сосудистых, желудочно-кишечных, бронхо-легочных, простудных), снятия болевых ощущений, снижения токсикозов, вызванных патологическим процессом, химио- и радиотерапией, для коррекции иммунного статуса, повышения общего самочувствия и качества жизни [6–8, 50].

В работах [2, 3] описана фитолектиновая активность «Чаговита». В монографии [3] подробно рассмотрено влияние «Чаговита» на индуцированный канцерогенез печени и пищевода. Клиническая апробация «Чаговита» проводилась в группах повышенного онкологического риска и при лечении хронических заболеваний (желудочно-кишечного тракта, мастопатии, синдрома отмены курения, псориаза, диабета и др.). По мнению авторов [6, 7], перспективно включение новых препаратов на основе чаги «Чаговит» и «Чагалюкс» в схемы комбинированного лечения онкологических больных, в процессе подготовки к хирургическим операциям, лучевой и химиотерапии или

между курсами химио- и радиотерапии с целью повышения эффективности лечения [7].

При приеме «Чаговита» и «Чагалюкса», как и многих других препаратов с чагой, рекомендуется соблюдать молочно-растительную диету, ограничить мясо, исключить копчености, консервы, пряности. Не рекомендуется запивать сладкой водой, употреблять в период приема «Чаговита» антибиотики, аспирин и спиртные напитки. Возможна индивидуальная непереносимость препаратов чаги, редки случаи аллергических реакций.

«Чаговит» – отечественный экстракт чаги, выпускается в капсулах по 30 штук в блистере. В состав фитокапсул «Чаговит» входит экстракт чаги, полученный по специальной оригинальной технологии. Известно, что в препарате экстракт чаги находится в сочетании с витаминами С, B_1, B_2, B_6, B_c. фолиевой кислотой. Комплекс биологически активных веществ, входящих в состав этого препарата, усиливает и дополняет стимулирующие, антиоксидантные, антитоксические, антибластомные и защитные свойства, оптимизирует активность ферментативной системы и метаболизма. Препарат показан при хроническом гастрите со сниженной кислотообразующей и ферментообразующей функцией желудка, колитах, полипозе желудка и кишечника, раке желудка, кишечника и прямой кишки. «Чаговит» назначается как элемент комплексной терапии в дозе 2 капсулы 2–3 раза в день за 20 мин до еды в течение 1,5–2 месяцев. Хранить фитокапсулы рекомендуется в сухом, защищенном от света месте при комнатной температуре [7].

«Чагалюкс» состоит из экстракта чаги, плодов шиповника (содержащего природные витамины, каротиноиды, флавоноиды, микроэлементы). «Чагалюкс» усиливает терапевтическую и профилактическую эффективность препарата. Его применяют внутрь по 1–2 капсуле 2–3 раза в день. Курс приема 1–2 месяца. Рекомендуются повторные курсы 3–4 раза в год. В лечебных целях на фоне традиционной фармакотерапии суточную дозу БАД можно увеличивать по согласованию с лечащим врачом [6, 7].

На российском рынке фармацевтических препаратов в последнее время очень интенсивно развивается сектор биологически активных добавок. Активный рост ассортимента БАД выдал на рынок новые препараты, в число которых входят и биологически активные композиции чаги [2, 3, 6-8, 20, 21, 35]. БАД в основном представлены в формах фитокомпозиций, фитосборов, драже, таблеток, порошков, сиропов и др.

Фитосборы и фитокомпозиции широко представлены в первую очередь продукцией ООО «НПП «ФИТОДАР». Разработанные в Иркутском государственном медицинском университете на кафедре фармакогнозии и ботаники Г.М. Федосеевой и Я.П. Пилипчуком оригинальные авторские фитокомпозиции на основе чаги практически реализуются на ООО «НПП «ФИТОДАР» в виде следующей продукции: ***фитокомпозиции «Чага»-«Astromelanini», «JAROCOR – Baikal» (фитокомпозиция № 1 на основе чаги – успокаивающая), «RADIXVITA – Baikal» (фитокомпозиция № 2 на основе чаги – тонизирующая), «GINEKOL – Baikal» (фитокомпозиция № 3 на основе чаги – гинекологическая), «HIPERTON – Baikal» (фитокомпозиция № 4 на основе чаги – седативно-гипотензивная), «NORMOPHIT – Baikal» (фитокомпозиция № 5 на основе чаги – очищающая), «UROPROSTON – Baikal» (фитокомпозиция № 12 на основе чаги – противовоспалительно-урогенитальная), фитокомпозиция «Чага» – FUNGUS nigra – «ASTROMELANINI», фитокомпозиция № 12 (урогенитальная) «NEPHROPROSTON – Baikal», фитокомпозиции «Чага Ag» и «Чагасол» и др.*** [50–54]. Данные сайтов [51, 52] свидетельствуют об успешном применении этих фитокомпозиций при лечении СПИДа, наркомании и энцелопатии, что говорит о целесообразности более широкого использования фитопрепаратов с чагой.

На сегодняшний день из всей линейки препаратов особое внимание вызывает препарат «Чага»-«Astromelanini». Он разработан по принципам традиционной тибетской медицины на основе экстракта из черных антарктических дрожжей «Astromelanin», который впервые был получен С.П. Ляхом [53]. «Astromelanin» – уникальный лечебно-оздоровительный препарат, содержащий комплекс биологически активных веществ, являющихся основой иммунитета, дающий возможность выжить в экстремальных условиях. Основные компоненты этого средства работают как универсальный восстановитель, выполняют роль антиоксидантов (ловушек свободных активных радикалов), способствуют регенерации клеток и омоложению тканей, корректируют и предотвращают мутагенные и канцерогенные процессы [52, 53].

По данным Я.П. Пилипчука [52] известно, что препарат «Astromelanin» с успехом прошел апробацию во многих ведущих клиниках США и РФ, а также применялся белорусскими учеными-клиницистами в зоне Чернобыльской АЭС.

Фитокомпозиция «Чага»-«Astromelanini» состоит из чаги, меланина (полученного по технологии «Astromelanin»), черники, грецкого ореха, серебра (Ag). Препарат не содержит спирта. Выпускается в форме банок по 1,0 г, 3,0 г, 6,0 г, 9,0 г сухого экстракта либо в капсулах по 100 мг (в 1 упаковке 30 капсул). Применяют по 1 капсуле в день натощак, возможно использование в виде 1–3% раствора (1:100; 3:100) внутрь в каплях под

язык и наружно. Курс лечения составляет 1–3 месяца, по необходимости можно повторить через 7–10 дней.

Ионизация ионами серебра всех компонентов позволяет усилить противовоспалительную функцию препарата, включая бактерицидное и антивирусное действие.

В этом комплексе БАВ чага выступает в качестве источника биологически активных веществ, относящихся к хромогенам, флавоноидам, аминокислотам (глицин, аспарагиновая, глютаминовая кислоты и т.д.), фитолектинам, фитостеринам, тритерпеновым и птериновым соединениям, полисахаридам и органическим кислотам, а также содержит макро- и микроэлементы (K, Mg, Ca, Na, Mn, Fe, Cu,Zn, Cr, Ag, а также N, S, P, Se, I, Br, Si и др.). В.Ф. Корсун и соавторы [2] оценили высокую фитолектиновую активность препаратов с чагой методом цитоаглютинации. Было показано, что лектины способны обратимо связывать углеводы, участвовать в их транспорте и депонировании, снижать уровень сахара в крови больных, страдающих сахарным диабетом. Благодаря их наличию и высокой фитолективной активности препараты рекомендуется использовать в профилактике и лечении гриппа. «Астромеланин» – порошкообразная полимерная субстанция, извлекаемая из биомассы черных антарктических дрожжевых бактерий. В живых клетках это вещество выработалось эволюционно, как защита от экстремальных условий среды обитания. Уникальным свойством меланинов (природных клеточных пигментов микробного, растительного и животного происхождения) является устойчивое свободнорадикальное состояние и высокое содержание парамагнитных центров. Черника обыкновенная выступает в качестве источника флавоноидов, органических кислот, пектинов, дубильных веществ, витаминов A, P, C, B_1 и B_6, а также микро- и макроэлементов. Грецкий орех богат витаминами группы B, C, E, а также макро- и микроэлементами.

Фитокомпозиция «Чага»-«Astromelanini» характеризуется антиоксидантным и протекторным, антимутагенным и иммуномодулирующим, биостимулирующим и регенерирующим, противоопухолевым и противовоспалительным, антиаллергическим и энтеросорбционным, адаптогенным и радиопротекторным, антитоксическим и тонизирующим действием. В комплексе все БАВ повышают сопротивляемость организма к инфекциям и мутациям, улучшают функцию печени, почек, сердечно-сосудистой системы, половых органов и органов кроветворения, повышают биоэлектрические потенциалы коры головного мозга и восстанавливают жизнедеятельность нервной ткани, а также влияют на сократительную способность миокарда и восстанавливают дыхательные ритмы.

Другие эксклюзивные лекарственные ***фитосборы*** на основе чаги [50-54].

«JAROCOR – Baikal» (фитокомпозиция № 1 на основе чаги – успокаивающая) – это порошковая смесь сырья различных лекарственных растений, входящих в Государственную фармакопею РФ XI издания [31, 37], широко используемых в тибетской и народной медицинах Сибири и Дальнего Востока. Лекарственный сбор, или фитокомпозиция, обладает противоопухолевым, антисклеротическим, успокаивающим, общеукрепляющим действием.

«RADIXVITA – Baikal» (фитокомпозиция № 2 на основе чаги – тонизирующая). Рекомендуется принимать при упадке сил, понижении потенции, импотенции, астении, физическом и умственном переутомлении, функциональных расстройствах нервной системы и для нормализации сердечно-сосудистой деятельности.

«GINEKOL – Baikal» (фитокомпозиция № 3 на основе чаги – гинекологическая). Используется при нарушениях менструального цикла, мастопатиях, бесплодии, хронических воспалительных заболеваниях и новообразованиях женских половых органов.

«HIPERTON – Baikal» (фитокомпозиция № 4 на основе чаги – седативно-гипотензивная). Благодаря оригинальному составу данный лекарственный сбор обладает гипотензивным, противоопухолевым, антисклеротическим, успокаивающим и общеукрепляющим действием.

«NORMOPHIT – Baikal» (фитокомпозиция № 5 на основе чаги – очищающая). Рекомендуется в качестве вспомогательного средства для улучшения обменных процессов на всех уровнях (включая клеточный и субклеточный). Применение этой фитокомпозиции дает возможность блокировать распад и выводить из организма избыточные жиры, углеводы и соли. Организм естественным путем омолаживается, получает антигельминтную профилактику и повышает жизнеустойчивость (иммуностимуляцию). Обладает антисклеротическим и противоопухолевым действием.

«UROPROSTON – Baikal» (фитокомпозиция № 12 на основе чаги – противовоспалительно-урогенитальная). Обладает выраженным противовоспалительным, мочегонным, желчегонным, противоопухолевым, антисклеротическим и регенеративным действием. Используется в комплексном лечении заболеваний простаты, при наличии мочекаменной болезни, воспалительных заболеваний урогенитальной системы (нефриты, пиелонефриты, циститы, уретриты), а также в гинекологии (воспалительные заболевания мочеполовых органов).

Все вышеперечисленные фитокомпозиции представляют собой смесь порошкованного сырья, в состав которого входят: березовый гриб (чага), различные виды трав, например трава леспедецы копеечниковой, трава астрагала перепончатого, листья крапивы, листья брусники, соцветия пижмы обыкновенной и многих других в соответствии с утвержденной рецептурой.

Рассматриваемые фитокомпозиции благодаря наличию чаги в их составе обладают в общем противовоспалительным, антисклеротическим, противоопухолевым, антиаллергическим, иммуностимулирующим, энергостимулирующим, общеукрепляющим и гепатопротекторным действиями.

Общие правила приема фитосборов заключаются в следующем: принимать препарат следует по 1 чайной ложке или по 3–4 капсулы 2 раза в день за 20–30 мин до еды. Курс составляет в среднем от 3 недель до 3-6 месяцев. Противопоказания: индивидуальная непереносимость [51–54].

По заказу Института фитотерипии и Института новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАН фирмой ООО «В-МИН» выпускаются ***фитокомпозиции «Чагаир» и «Чагален»*** [2, 3, 7].

«Чагаир» – это сбор трав, включающий порошок чаги, шлемник байкальский, копеечник забытый и другие травы. Выпускается в капсулах по 30 штук в блистере. Применяются по 2 г на 200 мл кипятка для приема в течение дня, таблетки по 0,5 г 3 раза в день перед едой 1–2 месяца. Оказывает иммуномоделирующее, тонизирующее, общеукрепляющее, противовоспалительное и противоопухолевое действие, рекомендуется при онкологических и урологических заболеваниях.

«Чагален» состоит из порошка ганодермы, вешенки, чаги, майтаке, лиственничной губки, шиитаке, хитозана полифракционного. Выпускается в таблетках по 0,5 г во флаконах. Применяются по 1 таблетке 3 раза в день во время еды на протяжении 2–3 месяцев [7, 52, 53]. БАВ, содержащиеся в грибах (лектины, 1-3/1-6)-бета-D-глюкан и др.), способны снижать артериальное давление и нормализовать липидный состав крови, усиливать реакции клеточного иммунитета, блокировать рост злокачественных опухолей, вызывать резкое торможение синтеза опухолью сосудистого фактора роста. Грибы содержат вещества, обладающие противоопухолевой активностью, вызывают деградацию раковых клеток, активируют макрофаги, Т-клетки, NK-клетки и другие эффекторные клетки. Это приводит к увеличению продукции антител, интерлейкинов (IL-1 и IL-2) и интерферона. Препараты являются источником лектинов и растительных волокон. Их можно использовать в качестве вспомогательного средства при профилактике и в составе комплексной терапии доброкачественных и злокачественных новообразований любой локализации и стадии процесса.

В период приема «Чагаира» и «Чагалена» следует иметь в виду, что возможны редкие случаи аллергии или индивидуальная непереносимость некоторых компонентов. При этом не рекомендуется принимать антибиотики, аспирин, спиртные напитки, сладкие напитки и продукты, содержащие мед и сахар.

В Санкт-Петербургской серии пищевых добавок «Драже жизни» МФОД «Счастье жизни» для оздоровления и профилактики организма выпускают БАД «Драже жизни – коктейль «Тростинка». Основу препарата составляют экстракт чаги, лактобактерии, молочная закваска, аминокислоты, микроэлементы, фруктовый пектин. БАВ чаги в данном препарате благоприятно сочетается с лактобактериями драже. Положительное влияние на работу клеток печени проявляется в активизации работы не только печеночных, но и кишечных и панкреатических ферментов, также препарат способствует восстановлению нормальной флоры кишечника и декантеминации (выведению) патогенной флоры. Рекомендуется онкологическим больным и больным с язвой желудка и гастритами, также хорошо подходит для лиц, склонных к аллергическим проявлениям [8].

БАД ***«Драже «Эктра-Бефунгин»*** украинской фирмы «Тенториум» выпускается в пластиковых баночках по 100, 200 драже, которые содержат в своем составе солод ферментированный, растительную клетчатку из пшеничных и ржаных зерен, экстракт березового гриба чага, зверобой, продукты пчеловодства – высококачественный мед, прополис. Употребление драже способно нормализовать кишечную микрофлору во время и после длительного приема лекарственных препаратов (дисбактериоз кишечника). В состав драже входит большое количество разнообразных микроэлементов, таких как калий, магний, цинк, медь, кобальт, молибден и железо. Препарат является эффективным корректором железодефицитных состояний, действует как мощный антиоксидант, иммуномодулятор и гепатопротектор.

БАД ***«Драже из чаги»***, выпускаемая компанией ООО «ХОРСТ», состоит из берёзового гриба чага и сахарного сиропа. Используется в профилактике развития онкологических заболеваний, для укрепления иммунитета и восстановления сил, очищения организма от шлаков, токсинов, солей тяжёлых металлов. Улучшает состояние кожи, помогая справиться с дерматитами, псориазом и экземой. Нормализует работу пищеварительной системы, благотворно влияя на состояние слизистых оболочек желудка и кишечника.

Таблетированные формы БАД представлены следующими препаратами [20, 21].

БАД ***«Литовит Ч»*** – биологически активная добавка к пище, содержит в своем составе берёзовый гриб чага (55%), монтмориллонит (25%), цеолиты (15%), воду (5%). Назначают по 3 таблетки вечером после еды в течение 5 дней с последующим перерывом 10 дней. По данным производителя НПР «Новь», средство способно положительно влиять на иммунодефицитные состояния и устранять явления интоксикации у онкологических больных на фоне комбинированной химиотерапии (КХТ), показано при хронических гастритах, дискинезии желудочно-кишечного тракта с явлением атонии, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, при синдроме хронической усталости.

БАД ***«Муммичага»*** фирмы ООО «Алтайский кедр» состоит из мумиё очищенного, экстракта чаги, лактозы, крахмала картофельного, стеарата магния. Способствует укреплению иммунитета, снимает боли различного происхождения, улучшает пищеварение и работу печени, нормализует деятельность сердечно-сосудистой системы, стимулирует кроветворение и функцию коры надпочечников, ускоряет заживление ран, способствует очищению организма от шлаков и тяжелых металлов.

БАД ***«Целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ) с чагой»*** состоит из микрокристаллической целлюлозы и чаги. Выпускаются в виде таблеток по 0,5 г в полимерной банке. Используется в качестве дополнительного источника пищевых волокон для очищения организма от шлаков и токсинов, нормализации липидно-углеводного обмена, укрепления иммунитета.

БАД ***«Берегиня»*** фирмы ООО «НПФ Гармония ВИТА» состоит из отрубей ржаных, чаги, цветков ноготков, травы зверобоя, травы череды, слоевища ламинарии (морской капусты), корней солодки. Рекомендовано к применению в следующих случаях: для фоновой терапии у женщин с мастопатией, особенно в сочетании с заболеваниями матки (миома, эндометриоз); женщинам в менопаузе для профилактики фиброзных изменений; женщинам в стрессовых ситуациях и с лабильной нервной реактивностью для профилактики дисгормональных нарушений; для улучшения работы желудочно-кишечного тракта; для защиты печени и усиления ее обеззараживающей функции, особенно во время приема гормональных и успокаивающих (седативных) препаратов; для профилактики мастопатии у женщин с высокой вероятностью ее развития.

Особой популярностью среди БАД пользуются сиропы, которые характеризуются простотой как получения, так и применения.

В продукции серии «Уссурийская тайга» разработана концентрированная основа для производства ***сиропов «Чага с травами»,*** включающая в себя смесь чаги, шиповника, череды, элеутерококка, мяты.

«Сироп «Чага» – БАД к пище, изготовленная на основе сахарного сиропа и экстракта чаги. Способ применения: взрослым и детям старше 12 лет по 1 чайной ложке 3–4 раза в день вместе с пищей. БАД улучшает обмен веществ, нормализует общее состояние и самочувствие больных, улучшает функциональное состояние желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой и нервной систем, повышает эффективность и переносимость основного лечения препаратами, назначенными врачом. Не рекомендован людям, страдающим сахарным диабетом, и при индивидуальной непереносимости некоторых компонентов препарата. Сироп «Чага» не вызывает привыкания, не токсичен [19–21].

Фирма ООО «Биостимул» выпускает БАД экстракт ***«Чагорин»*** содержащий в своем составе биомассу чаги и альгинат натрия. Показан для нормализации деятельности желудочно-кишечного тракта и кишечной микрофлоры; исключения кожных заболеваний, в том числе аллергического, грибкового и вирусного характера; способствует выведению из организма аллергических токсинов.

Ассортимент косметической продукции с биологически активными композициями чаги также достаточно разнообразен [20, 21, 55].

В косметической серии украинской фирмы «Amrita» присутствует целая линейка продуктов с экстрактом чаги (фитомеланином): ***«Amrita®, шампунь восстанавливающий», «Сливки очищающие Amrita®», «Amrita®, кондиционер восстанавливающий», «Amrita®, шампунь от перхоти»*** и др.

Экстракт чаги [фитомеланин (Fitomelanin™)], входящий в эту продукцию, способствует укреплению волосяной луковицы, восстановлению структуры поврежденных волос, устраняет воспаления, ломкость и посеченность их кончиков, стимулирует обновление кожи и рост здоровых волос. В сочетании с эфирным маслом чайного дерева осуществляется контроль скорости размножения грибковой микрофлоры кожи, что устраняет причину возникновения раздражения кожных покровов головы и образования перхоти. В состав также входит экстракт граната, который богат минеральными веществами и органическими кислотами, придающими волосам блестящий, гладкий и сильный вид. Выпускается в пластиковых баночках по 150–200 г [55].

В компании «Арт лайф» разработана рецептура ***«Крема-мыла с чагой»***. По данным сайта [56], все препараты фирмы адаптированы для российских условий и прошли экспертизу в Институте питания РАМН, а также апробированы в ведущих медицинских учреждениях Сибири.

«Крем-мыло с чагой» содержит в своем составе экстракты чаги и череды, Кремофор RH-40. Применяют для снятия раздражения и успокаивания кожи рук, обладает выраженным антисептическим действием. Кремофор RH-40 способствует ускоренному трансдермальному переносу и целенаправленной доставке биологически активных веществ.

ООО «Монастырская пивоварня» выпускает ***мыло «Березовая чага»***, которое подходит для любого типа кожи, обладает хорошим очищающим, антимикробным и капилляроукрепляющим действием. Входящие в состав мыла с чагой вещества являются природными стимуляторами, повышают иммунитет кожи, ее защитные функции; улучшают обмен веществ, стимулируют регенерацию клеток кожи.

Интернет-магазин «Мир Чаги» (ООО «ВИМ», г. Краснодар) [57] предлагает достаточно высокий ассортимент продукции на основе березового гриба чага, в частности ***мыло «Березовая чага»***, которое характеризуется хорошей мылкостью и способностью к пенообразованию, отсутствием аллергических реакций. Рекомендуется для омоложения кожи и устранения дерматологических эффектов.

О.Ю. Кузнецовой с соавторами [22, 58–61] на кафедре пищевой биотехнологии ФГБОУ ВПО «КНИТУ» разработана серия косметических средств с биологически активными композициями чаги, включающая мыла и скрабы ручной работы. В состав этой космецевтической продукции вводились экстракты чаги серии Фунги Б11 и Фунги Б13, получаемые по оригинальным методикам [49, 62]; в рецептуры скрабов в качестве абразивных частиц добавлялся шрот чаги, остающийся после ее экстрагирования. Качество данных разработок подтверждено дипломами и медалями на известных международных выставках научно-промышленных достижений «РосБиоТех-2014», «РосБиоТех-2013», «Биоиндустрия-2013».

В пищевой промышленности использование чаги встречается в различных производствах [20, 21].

В производстве безалкогольных напитков биологически активные композиции чаги используются, во-первых, при приготовлении сиропов [***«Чага с травами»*** (ООО «ПК «Лимонник»), ***«Сироп-сбитень № 7 «Багряный» («Виктория»)»***, ***«Сироп-сбитень № 24 «Молочный»*** (ООО «НИИ ЛОП и НТ», г. Новосибирск)]. Данная продукция применяется в качестве общеукрепляющего средства, способствует восстановлению сил организма после перенесенных травм и заболеваний, направлена в основном на профилактику онкологических и желудочно-кишечных заболеваний. Сиропы-сбитни рекомендуют использовать при укачивании в транспорте, для мобилизации сил и повышения внимания.

Во-вторых, биологически активные композиции чаги входят в состав прохладительных напитков, чаев, напитков для лечебно-профилактического питания. ***Травяной чайный напиток «Чага»*** в пакетиках используется в качестве заменителя привычного черного или зеленого чая. Травяной чай «Чага» – целебный напиток, обеспечивающий лечебный эффект при злокачественных новообразованиях. Рекомендуется принимать при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Улучшает общее состояние больных, снимает тошноту, болевые ощущения.

«Чага», чаговый чай» фирмы ООО «Биостимул» состоит из гриба чага, воды очищенной, натрия альгината или бензоата. Этот напиток рекомендуется в качестве общеукрепляющего средства для восстановления сил организма после перенесенных травм и заболеваний желудочно-кишечного тракта в сочетании с нарушениями кожных покровов, способствует снижению артериального давления и уровня сахара в крови.

Серия БАД ***«Сибирский чаговый чай»*** фирмы ООО «Экоцвет» состоит из нескольких продуктов, отличающихся добавками, например с листьями стевии, или вытяжкой из кедрового ореха, или чабрецом и т.д. Эти напитки в основном направлены на нормализацию деятельности желудочно-кишечного тракта, используются в качестве общеукрепляющего, иммуномодулирующего, антиоксидантного средства.

В-третьих, безалкогольные напитки функционального назначения с биологически активными композициями чаги широко представлены большим количеством бальзамов: ***«Бальзам антиоксидантный «Жемчужина Сибири»***, ***«Бальзам «Ольхон»***, ***«Бальзам «Хозяин тайги»*** (ООО «Тайга-продукт»), ***«Бальзам «Золотая Сибирь»*** (ООО «Сиб-Крук»), ***«Бальзам «Карельский»*** (ООО «Гудс Матрикс»), ***«Бальзам «Аптекарский садъ» («Валаамский монастырь»)*** (ООО «ААЛТО») и др. В основу всех бальзамов входит сахарный сироп, чага и большой набор различных лекарственных растений, их плодов, листьев, кореньев (как правило, не менее 10-15 компонентов).

Современная биологически активная добавка фирмы ООО «Тайга-продукт» ***«Бальзам антиоксидантный «Жемчужина Сибири»*** состоит из сахарного сиропа и экстракта из смеси дикоросов, обладающих антиоксидантной активностью, рекомендуется в качестве противоопухолевого, противовоспалительного, бактерицидного, сосудорасширяющего, иммуномодулирующего средства. Получение препарата «Бальзам антиоксидантный» осуществляется по оригинальной технологии из отборных высококачественных дикорастущих трав и растений Прибайкалья, веками используемых в народной медицине.

При производстве ликеро-водочной продукции биологически активные композиции чаги вводят в состав настоек и бальзамов. Так, Уржумский спиртоводочный завод выпускает спиртоводный бальзам ***«Чага»***, в состав которого помимо чаги входят яблочный спиртованный сок, настои вишни, черноплодной рябины, чёрной смородины, натурального мёда, вытяжки из 28 лечебных трав: душицы, чабреца, девясила, полыни горькой и др. Выпускаются в стеклянных бутылках 0,5 л бальзама спиртового.

В пищевых продуктах функционального назначения чагу включают, например, в медовые композиции. Так, ООО «НПФ «Пчела и человек» выпускает ***«Медовую композицию чаги»*** [состав: мёд натуральный, чага (*Fungus betulinus*)], упакованную в стеклянные банки по 230 г. Медовая композиция с чагой обладает болеутоляющим и противовоспалительным эффектом, нормализует обмен веществ, улучшает общее состояние и самочувствие, стимулирует кроветворный аппарат, улучшает состав крови, предотвращает развитие онкологических заболеваний, восполняет недостаток жизненно необходимых витаминов, понижает уровень сахара в крови и артериальное давление, оказывает общеукрепляющее и тонизирующее действие, предупреждает развитие воспалений, проникновение вирусов и развитие болезнетворных микроорганизмов, улучшает работу пищеварительной системы.

В ряде работ экстракты и меланины чаги серии Фунги Б12 [63] вводятся в рецептуры продуктов питания функционального назначения, таких как желейный мармелад [24, 25], майонезы и майонезные соусы [26–29], кремово-сбивные массы [30]. Показано, что в этих продуктах вводимые экстракты и меланины чаги выступают в качестве многофункциональных пищевых добавок, выполняя не только функции антиоксидантов, но и красителей и структурообразователей [24–30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведен обзор современной продукции с березовым грибом чага. Акцент делался на освещении препаратов, разрешенных для применения Министерством здравоохранения Российской Федерации, которые уже реализуются на российском фармацевтическом рынке и прогрессивно развивающемся рынке популярных в настоящее время БАДов.

Анализ литературных, патентных и электронных ресурсов показал высокий интерес к чаге как к перспективному лекарственному природному сырью, о чем свидетельствует большой ассортимент препаратов на ее основе. Причем надо отметить, что чага входит в состав этих продуктов как в качестве базовой основы, так и в виде одного из многочисленных компонентов. Препараты выпускаются в различных формах – экстрактах, настойках, бальзамах (спиртовых и на основе сиропов), гелей, мазей, кремов, таблеток, гранул, порошков, масел и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. О.Ю. Кузнецова. Сравнительная оценка шрота чаги // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 6. С. 189–193.
2. В.Ф. Корсун, Л.М. Краснопольская, Е.В. Корсун, М.А. Авхукова. Противоопухолевые свойства грибов. – М.: Практическая медицина, 2012. 210 с.
3. В.Ф. Корсун, К. А. Трескунов, Е.В. Корсун, А. Мицконас. Лекарственные растения в онкологии. – М.: Практическая медицина, 2007. 445 с.
4. Фитотерапия. Инновационные технологии XXI века // Материалы 8-й юбилейной международной научно-практической конференции. – Черноголовка: РАМН, ООО «НИПКЦ Восход-А», 2014. 249 с.
5. Чага и её лечебное применение при раке IV стадии. – Л.: Медгиз, 1959. 335 с.
6. М.Я. Шашкина, П.Н. Шашкин, А.В. Сергеев. Химические и медико-биологические свойства чаги (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Т. 40. № 10. С. 37–44.
7. М.Я. Шашкина, П.Н. Шашкин, А.В. Сергеев. Чага, Чаговит, Чагалюкс в лечебной и профилактической практике. – М.: Эдас, 2009. 64 с.
8. О.Ю. Кузнецова. Физико-химические характеристики и биологическая активность водных извлечений и полифенолоксикарбонового комплекса чаги: дисс. … к. хим. наук. – Казань. 2004. С. 158.
9. S.H. Lee, H.S. Hwang, J.W. Yun. Antitumor activity of water extract of a mushroom, Inonotus obliquus, against HT-29 human colon cancer cells // Phytother Res. 2009. V. 23. P. 1784–1789.
10. E.J. Kim, Y.J. Lee, H.K. Shim, J.H. Yoon. A study on the mechanism by which the aqueous extract of Inonotus obliquus induces apoptosis and inhibits proliferation in HT-29 human colon cancer cells // J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2006. V. 35. № 5. P. 516–523.
11. S.S. Ham, S.H. Kim, S.Y. Moon, M.J. Chung, C.B. Cui, E.K. Han, C.K. Chung, M. Choe. Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (Inonotus obliquus) extract // Mutation Research. 2009. V. 672. P. 55–59.
12. M.J. Chung, C.K. Chung, Y. Jeong, S.S. Ham. Anticancer activity of subfractions containing purecompounds of Chaga mushroom (Inonotus obliquus) extract

in human cancer cellsand in Balbc/c mice bearing sarcoma-180 cells // Nutr Res Pract. 2010. V. 4. P. 177–182.

13. S.H. Shin, Y.J. Kim, J. Park. Inhibition Effect of Cell Proliferation and Apoptosis by Inonotus obliquus in Human Glioblastoma U-87 MG Cells // J. Korean Soc. Food Sci. and Nutr. 2013. V.42. № 7. P. 1022–1028.
14. V.G. Babitskaya, V.V. Shcherba, N.V. Ikonnikova. Melanin complex of the fungus Inonotus obliquus // Appl. Biochem. Microbiol. 2000. V. 36. № 4. P. 377–381.
15. I.K. Lee, Y.S. Kim, Y.W. Jang, J.Y. Jung, B.S. Yun. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom Inonotus obliquus // Bioorg. Med. Chem. Letters. 2007. V. 17. P. 6678–6681.
16. X. Zhong, L. Wang, D. Sun. Effects of Inotodiol Extracts from Inonotus Obliquus on Proliferation Cycle and Apoptotic Gene of Human Lung Adenocarcinoma Cell Line A549 // Chin. J. Integr. Med. 2011. V. 3. P. 218–223.
17. W. Mazurkiewicz, K. Rydel, D. Pogocki, M.K. Lemieszek, E. Langner, W. Rzeski. Separation of an aqueous extract Inonotus obliquus (Chaga). A novel look at the efficiency of its influence on proliferation of A549 human lung carcinoma cells // Acta Poloniae Pharmaceutica. 2010. V. 67. № 4. P. 397–406.
18. W. Mazurkiewicz. Analysis of aqueous extract of Inonotus obliquus // Acta Poloniae Pharmaceutica. 2006. V. 63. № 6. P. 497–501.
19. Е.М. Сбитнева. Гриб чага против 100 болезней. – М.: РИПОЛ классик, 2009. 64 с.
20. Продукция компании ЗАО «ПКК «Крэй» (Cray Co LTD) URL: http://cray.su/chaga/chagaeng.html (дата обращения 23.12.2015).
21. О.Ю. Кузнецова и др. Лекарственные препараты и БАДы на основе чаги // XI Международная конференция «Пищевые технологии и биотехнологии» Сб. тез. докладов. – Казань: Отечество, 2010. С. 277.
22. О.Ю. Кузнецова. Разработка и исследование косметевтических средств с биологически активными композициями чаги. 1. Аппликационные лекарственные средства. Мыла. Скрабы // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 10. С. 129–133.
23. О.Ю. Кузнецова. Разработка кондитерских мармеладных изделий функционального назначения // Вестник Казанского технологического университета. 2013. Т. 16. № 20. С. 206–210.
24. О.Ю. Кузнецова, М.А. Клепцова, Д.А. Нигматуллина, М.А. Сысоева. Разработка рецептуры мармелада лечебно-профилактического действия // Научная сессия КНИТУ. Казань. 2012. С. 286.
25. О.Ю. Кузнецова, Д.А. Нигматуллина, М.А. Клепцова, М.А. Сысоева. Мармелад функционального назначения с экстрактом чаги // XII Международная конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии». Сб. тез. докладов. – Казань: Отечество, 2012. С. 233–234.
26. О.Ю. Кузнецова, К.А. Гладких, М.А. Сысоева. Использование природных антиоксидантов в технологии производства майонезов // XI Международная конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии». Сб. тез. докладов. – Казань: Отечество, 2010. С. 269.
27. О.Ю. Кузнецова, К.А. Гладких, М.А. Сысоева. Введение природного антиоксиданта меланина чаги в рецептуру майонезных эмульсий // Научная сессия КГТУ. Казань. 2011. С. 278.
28. О.Ю. Кузнецова, К.А. Гладких, Г.С. Степанова, М.А. Сысоева. Разработка рецептуры майонеза «Пикантный М» // Научная сессия КНИТУ. Казань. 2012. С. 287.
29. О.Ю. Кузнецова, К.А. Гладких, Г.С. Степанова, М.А. Сысоева. Сравнительный анализ антиоксидантов, обеспечивающих сохранность майонезных эмульсий // Научная сессия КНИТУ. Казань. 2012. С.288.
30. О.Ю. Кузнецова, А.А. Сафина, М.А. Сысоева. Использование меланинов чаги в производстве кремово-сбивных масс в качестве антиоксидантов // XII Международная конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии». Сб. тез. докладов. – Казань: Отечество, 2012. С. 129.
31. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 11 изд., доп. – М.: Медицина, 1990. 400 с.
32. М.А. Клюева. Лекарственные средства, применяемые в медицинской практике в СССР. – М.: Медицина, 1990. 512 с.
33. В Арчер. Малая грибная энциклопедия. – М.: Центрополиграф, 2000. 255 с.
34. А.И. Муравьев. Технология лекарственных средств: в 2 т. – М.: Медицина, 1980. 704 с.
35. О.Ю. Кузнецова. Анализ антиоксидантной активности препаратов «Бефунгин» разных производителей // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы IV Всероссийской конференции: в 2 кн. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2009. Кн. 2. С. 189.
36. Д.А. Муравьева. Фармакогнозия. – М.: Медицина, 1981. 714 с.

37. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. Справочник. – М.: Медицина, 2000. 576 с.

38. П.А. Якимов. Методы переработки чаги в лекарственные формы // Комплексное изучение физиологически активных веществ низших растений. М.-Л.: Наука, 1961. С. 129–138.

39. Л.Р. Юмаева. Состав и свойства экстрактов из шрота чаги: дисс. … к. хим. наук. – Казань. 2009. 135 с.

40. Г.Л. Рыжова, С.С.Кравцова, С.А.Матасова и др. Химические и фармакологические свойства сухого экстракта чаги // Химико-фармацевтический журнал. 1997. № 10. С. 44–47.

41. Патент РФ №1805968. Способ получения средства, обладающего противоязвенной и адаптогенной активностью / Г.Л. Рыжова, С.С.Кравцова, И.В. Богданова и др. 1993.

42. Растительные масла и масляные экстракты: технология, стандартизация, свойства. – М.: Русский врач, 2004. 264 с.

43. Т.Ф. Богданова. Общая фармакология в схемах и таблицах. – Ростов н/Д: Феникс, 2009. 175 с.

44. О.Ю. Кузнецова, Л.Ф. Давлятова. Современные представления о трансдермальных терапевтических системах // Биофармацевтический журнал. 2012. Т. 4. № 3. С. 12–20.

45. Т.П. Зюбр и др. Биотехнология и биомедицинская инженерия // Сборник трудов III Всероссийской научно-практической конференции с международном участием. – Курск. 2010. С. 270–272.

46. О.Ю. Кузнецова, Л.Ф. Давлятова. Аппликационные лекарственные средства – фитопленки с экстрактом чаги // Биофармацевтический журнал. 2012. Т. 4. № 4. 47–53.

47. О.Ю. Кузнецова. Изучение поверхности трансдермальных терапевтических систем с помощью атомно-силовой микроскопии // Биофармацевтический журнал. 2013. Т. 5. № 2. С. 13–21.

48. О.Ю. Кузнецова, Л.Ф. Давлятова, М.А. Сысоева. Изучение физико-химических свойств фитопленок с экстрактом чаги // Вестник Казан. технол. ун-та. 2012. Т. 15. № 8. С. 211–212.

49. Патент РФ № 2448721. Способ получения экстракта чаги / О.Ю. Кузнецова, М.А. Сысоева. 2011.

50. М.Я. Шашкина и др. Чага. Перспективы использования в лечебно-профилактической практике. – М.: Эдас, 2005. 140 с.

51. Фитотерапия в комплексном лечении урогенитальной патологии. URL: http://fitodar.web-box.ru/trening.html (дата обращения 10.11.2015).

52. Лечение рака с помощью чаги. Меланины – перспективные фармакологические препараты. Фитокомпозиция «Чага» Astromelanini». URL: http://fitodar.web-box.ru/news (дата обращения 10.11.2015).

53. С.П. Лях, М. Булгак, А. Исаев. Астромеланин. Меланинотерапия. – М. 2007. 168с.

54. И.А. Филиппова. Лечение лекарственными грибами. – СПб. 2004. 396 с.

55. Продукция фирмы «Амрита» с грибным фитомеланином Fitomelanin™ URL: http://amrita.ua/ (дата обращения 10.11.2015).

56. О продукции «Арт Лайф». URL: http://www.artlife-moscow.ru/info.php?id_info=4 (дата обращения 10.11.2015).

57. Мир Чаги. Чаговое мыло. URL: http://chaga-shop.ru/shop/folder/chagovoe-mylo (дата обращения 13.11.2015).

58. О.Ю. Кузнецова, М.А. Клепцова, Д.А. Нигматуллина, М.А. Сысоева. Получение мыла с добавлением экстрактов чаги // Научная сессия КНИТУ. Казань, 2012. С. 287.

59. О.Ю. Кузнецова, М.А. Клепцова, Д.А. Нигматуллина, М.А. Сысоева. Разработка рецептур косметевтических мыл с экстрактами и шротом чаги // XII Международная конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии». Сб. тез. Докладов. – Казань: Отечество, 2012. С. 121.

60. О.Ю. Кузнецова, М.А. Клепцова, Д.А. Нигматуллина, М.А. Сысоева. Косметевтические скрабы на основе экстрактов и шрота чаги // XII Международная конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии». Сб. тез. докладов. – Казань: Отечество, 2012. С. 122.

61. О.Ю. Кузнецова, М.А. Клепцова, Д.А. Нигматуллина, М.А. Сысоева. Разработка состава косметевтических средств на основе природных антиоксидантов // Всероссийская молодежная научная школа «Биоматериалы и нанобиоматериалы: Актуальные проблемы и вопросы безопасности». Казань, 2012. Сб. тез. докладов. – Казань: Отечество, 2012. С. 93.

62. Патент РФ № 2464032. Способ получения экстрактов гриба чага / О.Ю. Кузнецова, А.И. Носов, М.А. Сысоева. 2011.

63. Патент РФ № 2450817. Способ получения хромогенного комплекса чаги / О.Ю. Кузнецова, М.А. Сысоева. 2011.

УДК 543.544.943

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., 1

1 – Voronezh State University, 1, University Square, Voronezh, 394006, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: trineevaov@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА СЫРЬЯ И МАСЛЯНОГО ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ

О.В. Тринеева[1]*, А.И. Сливкин[1]

Резюме. Исследованы спектральные характеристики листьев и масляного экстракта крапивы двудомной в различных растворителях. Выявлены характеристические полосы поглощения, обусловленные присутствием каротиноидов и хлорофиллов. Методом спектрофотометрии определено содержание изучаемых пигментов в листьях крапивы двудомной и масляном экстракте. Методом двумерной ТСХ проведено разделение пигментов исследуемых объектов. Выявлены общие характеристические зоны, обнаруженные как на хроматограммах сырья, так и на хроматограммах масляного экстракта. Хроматографический профиль пигментов каждого вида сырья и масляного экстракта, полученного на его основе, имеет неодинаковый вид, что можно использовать в целях их стандартизации, используя метод «отпечатков пальцев» биологически активных веществ на хроматограммах. Содержание изучаемых биологически активных веществ в масляном экстракте на два порядка ниже по сравнению с листьями, что может быть связано с особенностями экстракции данных пигментов жирными растительными маслами. Проведен выбор наилучшего типа пластин для разделения пигментов листьев и масляного экстракта крапивы двудомной в тонком слое.

Ключевые слова: листья крапивы двудомной, масляный экстракт, пигментный состав, сравнительный анализ, «отпечатки пальцев», хроматографический профиль.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PIGMENT COMPOSITION FROM RAW MATERIALS AND OIL EXTRACT OF NETTLE LEAVES

O.V. Trineeva[1]*, A.I. Slivkin[1]

Abstract. Spectral characteristics of leaves and oil extract of a nettle by a two-blast furnace in various solvents are investigated. The characteristic strips of ab-sorption caused by presence carotenoids and chlorophylls are revealed. The method of spectrophotometry certain a content of studied pigments in leaves of a nettle by a two-blast furnace and an oil extract. The method bidimentional TLC leads division of pigments of investigated objects. The general characteristic zones detected as on the chromatograms of raw material, and an oil extract are revealed. Chromatographic profiles of pigments of each type of raw material and the oil extract received on its basis, has a unequal appearance that it is possible to use with a view of their standardization, using a method of «prints of fingers» biologically active substances on the chromatograms. Content of studied biologically active substances in an oil extract on two orders below in comparison with leaves that is maybe connected with features of allocation the given pigments fat vegetable oils. The choice of the best type of plates for division of pigments of leaves and an oil extract of a nettle by a two-blast furnace in a thin layer is lead.

Keywords: leaves of a nettle a two-blast furnace, an oil extract, structure of pigments, the comparative analysis, «prints of fingers», chromatographic profiles.

ВВЕДЕНИЕ

Содержание некоторых пигментов в составе растений зачастую определяет их фармакологическую активность. Так, хлорофилл, например, обладает противомикробными свойствами, регулирует работу сердца, нервно-мышечного аппарата, дыхательной системы. Каротиноиды способствуют нормализации обмена веществ, обладают антиоксидантным, иммуномодулирующим, противоопухолевым действием, а также некоторые представители проявляют А-витаминную активность [1]. Производные хлорофилла широко используются в качестве биологически активных добавок и красителей в пищевой и парфюмерно-косметической промышленности [1]. Хлорофиллы можно рассматривать как производные протопорфирина – порфирина с двумя карбоксильными заместителями (свободными или этерифицированными). Так, хлорофилл *a* имеет карбоксиметиловую группу при C_{10}, фитоловый эфир пропионовой кислоты – при C_7. Они имеют характерные спектры поглощения, пригодные для качественного и количественного определения состава пигментов [2, 3]. С помощью тонкослойной хроматографии можно быстро определять хлорофиллы в сырых экстрактах. Особенно богатым растительным источником хлорофиллов и каротиноидов является широко распространенное рудеральное растение – крапива двудомная.

Крапива двудомная издавна используется в медицине, и ее запасы легко вос-

производимы. Комплекс биологически активных веществ (БАВ) в ней оказывает благотворное влияние на состояние эпидермиса кожи головы и волосяных луковиц, применяется в качестве кровоостанавливающего средства [1]. В 2014 году утверждена новая фармакопейная статья (ФС) для включения в ГФ XIII изд. «Крапивы двудомной листья», в которой по аналогии с Европейской Фармакопеей предусмотрено количественное определение гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую [4]. Дополнительное определение хлорофилла в листьях крапивы было отклонено Фармакопейным комитетом.

Масляные экстракты (МЭ) на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС) широко используют в фармации в качестве лекарственных препаратов и биологически активных добавок. Комплекс БАВ МЭ, среди которых важнейшими являются каротиноиды, фосфолипиды, токоферолы, биофлавоноиды, полиненасыщенные жирные кислоты и фитостерины, определяет их биологическую ценность. В настоящее время, согласно нормативной документации (НД), в МЭ фармацевтического назначения не нормируется содержание БАВ. Согласно проекту ОФС «Масла жирные растительные», разработанного для ГФ XIII изд., определению подвергаются различные группы БАВ в соответствии с частными ФС [5]. Для определения соответствия МЭ рекомендуется использовать нормативы СанПин 2.3.2.1078-01 [6] для БАД на основе растительных масел. Физико-химические показатели, а также показатели безопасности применения МЭ (тяжелые металлы, радионуклиды и пестициды), по которым оценивают их качество, недостаточно полно характеризуют их фармакологические свойства и не дают информации о качественном и количественном составе БАВ. МЭ листьев крапивы укрепляет волосяные луковицы, устраняет перхоть, стимулирует рост волос, предупреждает раннюю седину.

В связи с этим целью исследования явилось сравнительное качественное и количественное определение пигментов в листьях и масляном экстракте листьев крапивы двудомной (хлорофиллов и каротиноидов) для нормирования данных показателей и совершенствования существующей НД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали готовое измельченное сырье, а также МЭ листьев крапивы двудомной отечественных производителей. Извлечения готовили путем нагревания ЛРС с экстрагентом в соотношении 1,5:100 на водяной бане с обратным холодильником в течение 20 мин. Полученные экстракты фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые порции фильтрата. Для оценки влияния состава экстрагента на химический состав получаемого извлечения использовали ацетон и 96% этиловый спирт.

Для исследования спектральных характеристик МЭ применяли метод дифференциальной спектрофотометрии. Электронные спектры поглощения изучаемого МЭ в различных растворителях сняты на спектрофотометре по отношению к раствору рафинированного подсолнечного масла в соответствующем растворителе. Выбор раствора сравнения обусловлен технологическими особенностями производства МЭ. В работе использовали растворители марки х.ч. с различными значениями полярности (от 0 до 5,4 ед.).

Количественное содержание каротиноидов и хлорофиллов в исследуемых объектах определяли методом спектрофотометрии в видимой области (СФ-2000-01, Россия, ОКБ «Спектр»).

Сравнительное исследование качественного пигментного состава изучаемых объектов проводили методом хроматографии в тонком слое сорбента на пластинках марки Sorbfil (ПТСХ-АФ-А и ПТСХ-П-В, Россия) размером 10×10 и 10×15 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр поглощения изучаемого ЛРС в различных растворителях показал наличие максимумов, характерных для хлорофилловых и каротиноидных соединений, что экспериментально подтверждает присутствие данных пигментов в изучаемом объекте (рисунок 1). Как видно из рисунка 1, при использовании ацетона в качестве экстрагента наблюдается большее выделение изучаемых пигментов, особенно каротиноидов. Поэтому для дальнейших исследований был выбран данный растворитель для получения вытяжек из ЛРС.

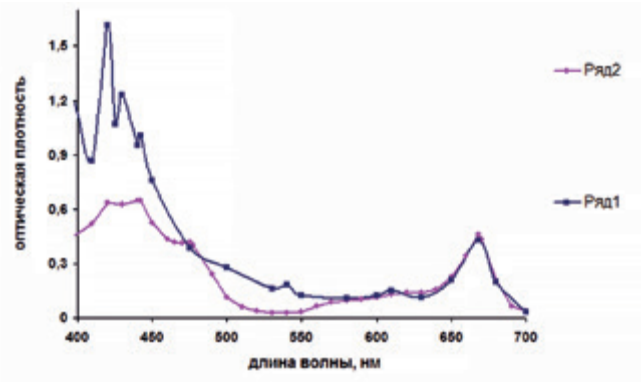


Рисунок 1. Вид спектра поглощения извлечений из листьев крапивы в различных растворителях в видимой области: 1 – ацетон; 2 – 96% этанол

В результате выявлены характеристические полосы поглощения МЭ в различных растворителях, обусловленные присутствием в нем различных групп

БАВ (таблица 1). На рисунке 2 приведен вид дифференциальных спектров поглощения МЭ листьев крапивы двудомной в различных растворителях в диапазоне длин волн 300–770 нм.

Таблица 1.

Спектральные характеристики МЭ листьев крапивы двудомной в различных растворителях

МЭ	Величина λ(max) в различных растворителях				
	гексан	н-бутанол	этилацетат	хлороформ	ацетон
МЭ листьев крапивы	317	308	–	314	310
	–	–	320	320	–
	420	422	420	422	420
	440–455	442–456	444–456	452	442–454
	480	472–486	–	478–490	474–480
	539	542	539	542	540
	611	615	–	612	–
	672	671	–	671	669

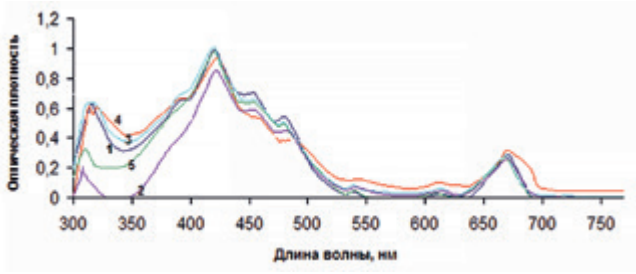


Рисунок 2. Дифференциальные спектры поглощения МЭ листьев крапивы в различных растворителях (1 – гексан; 2 – н-бутанол; 3 – этилацетат; 4 – хлороформ; 5 – ацетон)

Выявленные полосы поглощения могут соответствовать следующим группам БАВ: 320–360 нм – фенольные соединения; максимумы 420, 440–456, 472–490 нм близки к спектрам каротиноидов и жирных кислот; полосы в диапазоне 539–542 нм характерны для антоцианов; 653–672 нм – для хлорофилловых соединений [1].

Важнейшая особенность спектра поглощения хлорофилла *a* и *b* – наличие у них двух ярко выраженных максимумов: в красной – соответственно при 660 и 640 нм и в сине-фиолетовой областях спектра – при 420 и 450 нм [2, 3]. Максимальное поглощение в красной области спектра при 660 и 640 нм объясняется наличием коньюгированной системы двойных и одинарных связей замкнутой тетрапиррольной структуры. Основная циклическая система сопряженных двойных связей, образующая делокализованную π-орбиталь, имеет ряд дополнительных сопряжений (винильная группа в 1-м ядре, вторая полуизолированная связь во 2-м ядре, карбонильная группа в 5-м кольце). В результате возникает сложно разветленная коньюгированная система, которая и обеспечивает наибольший максимум в этой области [3]. Второй максимум при 420 и 450 нм объясняется центральным атомом магния, включенным в тетрапиррольную структуру. Влияние магния осуществляется через атомы азота пиррольных ядер. Спектральные характеристики БАВ связаны с влиянием растворителей [3, 7]. В растворах за счет межмолекулярных взаимодействий происходит изменение в состоянии электронов молекул. Это приводит к смещению полос поглощения в различных растворителях. Установлено, что с увеличением полярности растворителя происходит батохромный сдвиг полосы поглощения, обусловленной присутствием каротиноидов (таблица 1), а также гиперхромный сдвиг полосы, характерной для хлорофилловых соединений. Об ассоциациии производных хлорофилла в МЭ до олигомеров свидетельствует смещение характеристической полосы (667 нм) в длинноволновую область (670–672 нм) спектра (таблица 1). Характер спектра указывает на образование олигомера как линейной, так и «сэндвичевой» структур и, видимо, представляет собой смесь этих и промежуточных форм связи между молекулами олигомера. Образование олигомеров, по-видимому, происходит за счет сложноэфирной группировки хлорофилла [3, 7].

Спектры поглощения изучаемого ЛРС и полученного на его основе МЭ в различных растворителях показали наличие максимумов, характерных для хлорофилловых и каротиноидных соединений, что экспериментально доказывает присутствие данных пигментов. По полученным данным рассчитывали их количественное содержание в исследуемых образцах по уравнению Хольма – Ветштейна [1, 2, 8, 9]. Результаты представлены в таблице 2.

В сырье крапивы двудомной в сумме хлорофиллов превалирует хлорофилл *a*, в то время как в МЭ содержание данных хлорофиллов находится примерно в одинаковом соотношении (таблица 2), что может быть связано с особенностями экстракции данных пигментов липофильными растворителями.

В целом содержание изучаемых БАВ в МЭ на два порядка ниже по сравнению с ЛРС. МЭ (медицинские масла) – это извлечения из ЛРС, приготовленные с использованием растительных или минеральных масел. Неэффективность масляной экстракции объясняет

Таблица 2.

Результаты определения содержания пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в исследуемых объектах

№ п/п	Исследуемый объект	Содержание пигментов в исследуемых объектах, мг/г		
		Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*	Сумма каротиноидов и ксантофиллов
1	МЭ листьев крапивы	0,0137±0,0027	0,0130±0,0025	0,0599±0,0003
2	Листья крапивы двудомной (в пересчете на воздушно-сухое сырье)	2,7138±0,0687	1,0072±0,0563	5,0960±0,0374

длительность и многоступенчатость процедуры. Так, например, из мякоти облепихи (при влажности 14%) достаточно полно извлекаются жирорастворимые витамины и каротиноиды только после 4-кратной экстракции при 55–60 °С [10, 11].

Для сравнительного исследования качественного пигментного состава исследуемых объектов на следующем этапе работы проводили хроматографическое разделение изучаемых БАВ в тонком слое сорбента. На стартовую линию хроматографических пластин марки Sorbfil наносили ацетоновое извлечение из ЛРС, полученное как описано выше, в количестве 40 мкл. МЭ растворяли в ацетоне в соотношении 1:1 и наносили на сорбент в количестве 20 мкл. В работе использовали различные пластины для ТСХ (таблица 3).

Таблица 3.

Характеристика хроматографических пластин, использованных для разделения пигментов изучаемых объектов

№ п/п	Характеристика пластины	Тип пластины	
		ПТСХ-АФ-А	ПТСХ-П-В
1	Тип сорбента	Силикагель СТХ-1А	Силикагель СТХ-1ВЭ
2	Зернение, мкм	5-17	8-12
3	Толщина слоя, мкм	90-120	100
4	Связующее	Силиказоль	
5	Подложка	Алюминиевая фольга	ПЭТФ
6	Размер пластин, см	10×15	

Хроматографирование осуществляли в системе петролейный эфир – этанол (16:1), обоснование выбора которой для разделения пигментов листьев крапивы двудомной проведено ранее авторами в работе [12]. Тип пластин также может оказать существенное влияние на качество разделения зон БАВ на хроматограммах. Поэтому в работе проведена сравнительная характеристика различных пластин для ТСХ с целью выбора наиболее эффективных.

Эффективность хроматографического процесса определяется величиной N (число теоретических тарелок). Высота слоя, на котором обеспечивается хроматографическое разделение, разбивается на теоретические разделяющие тарелки. Эффективность сорбента тем выше, чем уже получается зона при том же значении величины относительной скорости перемещения вещества (R_f). Чем выше эффективность, тем больше N, тем меньше размывание зоны на хроматограмме и лучше разделение. На хроматограммах также рассчитывают высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ), и приведенную высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ПВЭТТ). На основании данных параметров возможно провести сравнение эффективности различных сорбентов. Величина ПВЭТТ позволяет для двух любых пластин оценить качество сорбента независимо от длины пластины, зернения сорбента и его природы [13].

Селективность сорбции (L) определяется отношением коэффициентов распределения двух веществ (K_1/K_2). Величина К, называемая коэффициентом распределения, определяется отношением количества растворенного вещества, находящегося в неподвижной фазе, к количеству этого же вещества в подвижной фазе в состоянии равновесия. Многокомпонентная смесь может быть хроматографически разделена на компоненты только в том случае, когда значения К в выбранной системе (для этих компонентов) различаются. Чем выше К, тем больше время пребывания растворенного вещества в неподвижной фазе. Следовательно, разделение обеспечивается благодаря тому, что при элюировании вещество с меньшим К оказывается в подвижной фазе в течение большего периода времени. В результате это вещество переносится дальше, чем вещество с большим К.

Для каждого анализируемого типа пластин (таблица 4) на хроматограммах (рисунок 3) после разделения были рассчитаны величины R_f; ВЭТТ; ПВЭТТ и N [13]. Результаты расчета параметров хроматографического разделения пигментов листьев крапивы двудомной на двух типах пластин для ТСХ представлены в таблице 4.



Рисунок 3. Вид хроматограммы извлечения из листьев крапивы двудомной (40 мкл) при просмотре в видимом свете (тип пластины ПТСХ-АФ-А)

В использованной элюирующей системе наблюдается удовлетворительное разделение хроматографических зон изучаемых пигментов, так как значение селективности сорбции больше единицы (таблица 4). Чем больше величина L, тем лучше будет разделение, так как зоны компонентов располагаются друг от друга на большом расстоянии [13]. Однако показатели эффективности хроматографического разделения пигментов в тонком слое достигают больших значений при использовании пластин типа ПТСХ-П-В (таблица 4).

Следует отметить, что при однократном элюировании даже при высоте пробега растворителя более 13 см разделение зон изучаемых БАВ на хроматограммах нельзя считать полным ввиду богатого состава пигментов в листьях крапивы двудомной. Одна хроматографическая зона может содержать несколько веществ со сходными параметрами удерживания в данных условиях проведения ТСХ-анализа. Проведение двумерного хроматографирования позволило решить данную проблему (рисунок 4). В отличие от одномерной двумерная ТСХ сопоставима с колоночной хроматографией по разрешающей способности [13]. На основании ранее полученных результатов для проведения двумерного хроматографирования исследуемых пигментов в ЛРС и МЭ использовали пластины марки Sorbfil ПТСХ-П-В размером 10×10 см. Наилучшее разделение и качество хроматографических зон было

Таблица 4.

Параметры хроматографического разделения пигментов листьев крапивы двудомной на двух типах пластин для ТСХ

№ зоны	R_f	N	ВЭТТ, мкм	ПВЭТТ	K	L	Окраска в видимом свете
ПТСХ-АФ-А							
1	0,025	40,00	3,00	272,72	39,00	–	Серо-зеленая
2	0,092	82,76	1,45	131,82	9,87	3,95	Желтая
3	0,150	134,83	0,89	80,81	5,67	1,74	Оранжево-желтая
4	0,210	333,33	0,36	32,72	3,77	1,50	Оранжево-желтая
5	0,260	413,79	0,29	26,39	2,85	1,32	Светло-зеленая
6	0,360	324,32	0,37	33,83	1,78	1,60	Желтая
7	0,410	235,29	0,51	46,38	1,44	1,24	Светло-зеленая
8	0,450	131,87	0,91	82,49	1,22	1,18	Светло-зеленая
9	0,575	169,01	0,71	64,56	0,74	1,65	Ярко-зеленая
10	0,640	255,32	0,47	42,50	0,56	1,32	Светло-зеленая
11	0,720	285,71	0,42	38,05	0,39	1,44	Зеленая
12	0,770	307,69	0,39	35,57	0,30	1,30	Темно-зеленая
13	0,880	157,89	0,76	69,47	0,13	2,31	Серо-зеленая
14	0,940	69,36	1,73	157,68	0,06	2,17	Зеленовато-серая
15	0,980	55,30	2,17	197,23	0,02	3,00	Оранжевая
ПТСХ-П-В							
1	0,010	8,31	16,00	1600	124,06	–	Серо-зеленая
2	0,030	33,25	4,00	400	32,33	3,84	Желтая
3	0,075	53,20	2,50	250	12,33	2,62	Оранжево-желтая
4	0,120	85,26	1,56	156	7,33	1,68	Оранжево-желтая
5	0,160	175,00	0,76	76	5,26	1,39	Светло-зеленая
6	0,190	207,81	0,64	64	4,27	1,23	Желтая
7	0,290	207,81	0,64	64	2,44	1,75	Светло-зеленая
8	0,380	271,43	0,49	49	1,62	1,51	Светло-зеленая
9	0,420	458,62	0,29	29	1,38	1,17	Ярко-зеленая
10	0,490	532,00	0,25	25	1,04	1,33	Светло-зеленая
11	0,570	403,03	0,33	33	0,75	1,39	Зеленая
12	0,600	424,92	0,31	31	0,66	1,14	Темно-зеленая
13	0,800	143,01	0,93	93	0,24	2,75	Серо-зеленая
14	0,88	633,33	0,21	21	0,14	1,71	Зеленовато-серая
15	0,98	103,10	1,29	129	0,02	7,00	Оранжевая

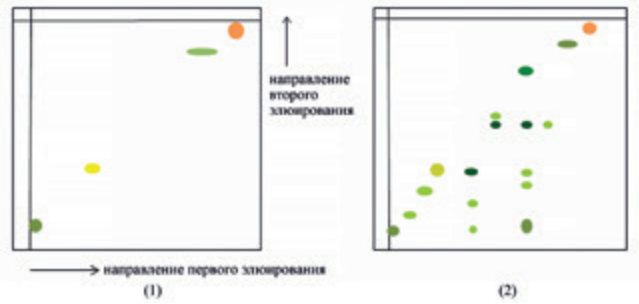


Рисунок 4. Вид двумерных хроматограмм МЭ (1) и извлечения из листьев крапивы двудомной (2) при просмотре в видимом свете (тип пластины ПТСХ-П-В)

достигнуто при элюировании в системе петролейный эфир – этанол (16:1) в двух направлениях. Вид двумерных хроматограмм МЭ и извлечения из листьев крапивы двудомной представлен на рисунке 4.

На хроматограммах с извлечением из листьев крапивы двудомной обнаружено 17 зон каротиноидов и хлорофиллов, идентифицированных по характерному окрашиванию в видимом свете. На хроматограммах МЭ листьев крапивы двудомной проявлялись 4 зоны (по две каротиноидной и хлорофилловой природы), являющиеся характерными и для ЛРС (таблица 5). В случае двумерного хроматографирования величина R_f для разделяемых веществ в качестве критерия подлинности в литературе, как правило, не приводится. Возможно, это связано со значительным увеличением ошибки расчета данного параметра. В последнее время для ЛРС, извлечения из которого содержат целый комплекс БАВ различной природы, для идентификации и оценки качества рекомендуют использовать метод «отпечатков пальцев» на хроматограммах или хроматографический профиль [14]. При двумерном хроматографировании целесообразнее для оценки расположения зон на хроматограммах использовать их координаты, в качестве которых могут рассматриваться известные в ТСХ величины (Z_0 – расстояние от линии погружения до стартовой линии, мм; Z_f – путь, пройденный фронтом растворителя, мм; Zx – длина пути, пройденного пятном, мм). Характеристика хроматографических профилей пигментов ЛРС и МЭ крапивы двудомной представлена в таблице 5.

Полученные виды двумерных хроматограмм пигментов ЛРС и МЭ крапивы двудомной (рисунок 4) могут служить дополнительным критерием качества и подлинности, так как любые отступления от технологического регламента при заготовке, сушке и хранении сырья, извлечении экстракта сказываются на хроматографическом профиле. Кроме того, каждый вид ЛРС характеризуется своим уникальным набором каротиноидов и хлорофиллов.

Таблица 5.

Характеристика хроматографических профилей пигментов ЛРС и МЭ крапивы двудомной (при $Z_{01}=Z_{02}=5$ мм и $Z_{f1}=92$ мм; $Z_{f2}=85$ мм)

№ зоны	$Zx_1 \pm 2$, мм	$Zx_2 \pm 2$, мм	Окраска зоны в видимом свете	Вид пигмента
Листья крапивы двудомной				
1	87	76	Желто-оранжевая	β-каротин
2	77	66	Зеленовато-серая	хлорофилл
3	68	27	Зеленая	хлорофилл
4	55	42	Серо-зеленая	хлорофилл
5	55	27	Ярко-зеленая	хлорофилл
6	55	17	Зеленая	хлорофилл
7	55	13	Зеленая	хлорофилл
8	55	1	Зеленая	хлорофилл
9	40	32	Желтая	ксантофилл
10	40	30	Зеленая	хлорофилл
11	32	17	Светло-зеленая	хлорофилл
12	32	8	Желтая	ксантофилл
13	32	1	Желтая	ксантофилл
14	24	17	Желтая	ксантофилл
15	15	10	Желтая	ксантофилл
16	5	4	Желтая	ксантофилл
17	2	1	Серо-зеленая	хлорофилл
МЭ листьев крапивы двудомной				
1	88	77	Желто-оранжевая	β-каротин
2	74	68	Зеленовато-серая	хлорофилл
3	25	19	Желтая	ксантофилл
4	2	1	Серо-зеленая	хлорофилл

Zx_1 – длина пути, пройденного пятном в направлении первого элюирования, мм; Zx_2 – длина пути, пройденного пятном в направлении второго элюирования, мм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе исследованы спектральные характеристики ЛРС и МЭ листьев крапивы двудомной в различных растворителях в широком диапазоне полярностей от 0 до 5,4 ед. Выявлены характеристические полосы поглощения, обусловленные присутствием изучаемых пигментов. Методом спектрофотометрии в видимой области определено содержание каротиноидов и хлорофиллов в листьях крапивы двудомной и полученном на их основе МЭ. Содержание изучаемых БАВ в МЭ на два порядка ниже по сравнению с ЛРС, что может быть связано с особенностями экстракции данных пигментов жирными растительными маслами. С позиций теоретических основ ТСХ проведен выбор наилучшего типа пластин для разделения пигментов ЛРС и МЭ крапивы двудомной. Рассчитаны параметры, характеризующие эффективность процесса хроматографирования в тонком слое. Методом двумерной ТСХ проведено разделение БАВ изучаемого ЛРС и МЭ, полученного на его основе. Выявлены общие характеристические зоны, присутствующие как на хроматограммах ЛРС, так и на хроматограммах МЭ. Установлено, что лишь незначительная часть хлорофиллов и каротиноидов экстрагируется жирным маслом, что согласуется с данными количественного определения. Хроматографический профиль пигментов каждого вида сырья и МЭ, полученного на его основе, имеет индивидуальный вид, что можно использовать в целях их стандартизации, используя метод «отпечатков пальцев» БАВ на хроматограммах.

ЛИТЕРАТУРА

1. 1. О.В. Тринеева, А.И. Сливкин, С.С. Воропаева. Определение каротиноидов и хлорофиллов в листьях крапивы двудомной // Материалы 5-й Всероссийской с международным участием научно-методической конференции «Фармобразование-2013». Ч. II. – Воронеж. 2013. С. 549–552.
2. А.А. Землянухин, Л.А. Землянухин. Большой практикум по физиологии и биохимии растений: Учеб. пособие. – Воронеж: ВГУ, 1996. 188 с.
3. В.И. Антонов, В.И. Ягодин. Спектральные характеристики препаратов хлорофилла из еловой древесной зелени // Химия раст. сырья. 2006. № 2. С. 47–49.
4. Крапивы двудомной листья: ФС для ГФ XIII издания. URL: http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakopeynyh-statey (дата обращения 11.10.2015).
5. Масла жирные растительные: ФС для ГФ XIII издания. URL: http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakopeynyh-statey (дата обращения 11.10.2015).
6. СанПин 2.3.2. 1078-01 от 14.11.01/22.03.02. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов (с изменениями и дополнениями 1-14). Разделы «Общие положения», «1.7.2. Масло растительное (все виды)», «1.10. Биологически активные добавки к пище», «1.10.7. БАД на растительной основе, в.ч. цветочная пыльца», «1.10.2. БАД на основе преимущественно липидов животного и растительного происхождения». 2009.
7. О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, С.В. Снопов, А.И. Сливкин. Исследование спектральных характеристик растительных масел и масляных экстрактов, применяемых в фармации // Материалы Всероссийской с международным участием научно-методической конференции «Фармобразование-2010». Ч. II. – Воронеж. 2010. С. 403–406.
8. О.Г. Струсовская. Определение пигментного состава Cochlearia officinalis, произрастающей на островах соловецкого архипелага // Материалы V международной конференции «Фармация и общественное здоровье». – Екатеринбург. 2012. С. 184–187.
9. А.В. Белякова, В.А. Вайнштейн, К.В. Маркова и др. Применение синтетических эфиров высших жирных кислот для экстрагирования листьев крапивы // Хим.-фарм. журнал. 2005. Т. 39. № 11. С. 35–39.
10. О.В. Рыбакова, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин, Г.А. Оголь. Определение суммы каротиноидов в растительных маслах и масляных экстрактах // Материалы 3-й Всероссийской научно-методической конференции «Фармобразование-2007». Ч. 1. – Воронеж. 2007. С. 306–308.
11. О.В. Тринеева, Е.Ф. Сафонова. Сравнительная характеристика растительных масел и масляных экстрактов, применяемых в фармации // Химия растительного сырья. № 4. 2013. С. 77–82.
12. О.В. Тринеева, С.С. Воропаева, А.И. Сливкин. Выбор оптимальной системы для определения пигментов листьев крапивы двудомной методом ТСХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. Вып. 2. С. 213–219.
13. Ф. Гейсс. Основы тонкослойной хроматографии. – М.: Мир, 1999. 405 с.
14. О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин. Идентификация растительных масел и масляных экстрактов методом ТСХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Вып. 4. С. 646–653.

medima MedSib

Выставка медицинского оборудования, инструментов и материалов

17–19 мая 2016

Новосибирск
ул. Станционная, 104











Разделы выставки

- Медицинские изделия и расходные материалы
- Медицинское оборудование и техника
- Программное обеспечение для медицинских учреждений
- Фармацевтические препараты и БАДы

ITE
+7 (383) 363-00-63
medima@sibfair.ru

www.medimaexpo.ru

УДК 614.272, 615.074

ПРИМЕНЕНИЕ ПРИНЦИПА СКВОЗНОЙ СТАНДАРТИЗАЦИИ В АНАЛИЗЕ ФЛАВОНОИДОВ ТРАВЫ ПУСТЫРНИКА И ПРЕПАРАТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

А.И. Марахова[1]*, А.А. Сорокина[2], Я.М. Станишевский[1]

1 – ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

2 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 2, стр. 1

1 – Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – I.M. Sechenov First Moscow State Medicinal University, 2/1, Trubeckaya str., Moscow, 119991, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: agentcat85@mail.ru
Тел.: 8 (499) 936 85 99

Резюме. В статье представлены данные по разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в траве пустырника и экстракционных препаратах спектрофотометрическим методом. Показаны особенности и возможности применения дифференциальной фотометрии в «сквозной» стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Обосновано подкисление растворов для образования комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом в соотношении 1:1.

Ключевые слова: трава пустырника, настойка и настой травы пустырника, спектрофотометрия, флавоноиды.

APPLICATION OF THROUGH STANDARDIZATION PRINCIPLE IN THE ANALYSIS OF FLAVONOIDS MOTHERWORT (*LEONURUS*, L.) HERB AND IT'S PREPARATION

A.I. Marakhova[1]*, A.A. Sorokina[2], Ya.M. Stanishevskiy[1]

Abstract. The article presents data on the development of methods of quantitative determination of total flavonoids in the motherwort (*Leonurus*, L.) herb, infusion and tincture spectrophotometric method. The features and applications of differential photometry "through" standardization of medicinal plants and drugs based on it. It is proved, that adding acid leads to the formation of complexes of flavonoids with aluminum chloride in a ratio of 1:1.

Keywords: motherwort herb, tincture and the infusion of herbs Leonurus, spectrophotometry, flavonoids.

ВВЕДЕНИЕ

В отечественной нормативной документации (НД) [1] трава пустырника стандартизуется по содержанию суммы экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом, и сумме иридоидов. Европейская Фармакопея (ЕФ) предполагает определение суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид посредством дифференциальной фотометрии после реакции с алюминия хлоридом [4].

Методика является достаточно трудоемкой и длительной в исполнении, предполагает использование нескольких агрессивных органических растворителей. Кроме того, методика ЕФ не применима для сквозной стандартизации сырья и препаратов, т.к. не воспроизводится в анализе водных и водно-спиртовых извлечений. В связи с этим следующей задачей стала разработка более простой и универсальной методики [6].

Как известно из литературных данных, пустырник содержит флавоноиды, составляющие значительную долю метаболома его экстракционных препаратов [2]. Поэтому флавоноиды могут быть рассмотрены как вторая группа БАВ, по которой возможна стандартизация сырья, используемого для производства водно-спиртовых извлечений.

Согласно принципу сквозной стандартизации [3] установление содержания одной и той же группы БАВ в сырье и препаратах должно проводиться с использованием одного и того же метода.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы стала разработка методики количественного анализа флавоноидов в траве пустырника и его лекарственных препаратах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось с использованием промышленного образца травы пустырника фирмы-производителя ЗАО «Здоровье» серии 04583, настойки и настоя пустырника, полученных согласно методикам ГФ XI издания [1]. Спектрофотометрические исследования проводились на спектрофотометрах Specord M40 (Specord, Германия) и Agilent Cary Eclipse (Agilent Technologies, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для подтверждения присутствия флавоноидов были проведены качественные реакции с водным и спиртовым извлечением из травы пустырника (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты качественных реакций на флавоноиды с извлечениями из травы пустырника и настойкой пустырника

	Анализируемый образец	Реакция			
		С раствором алюминия хлорида	Проба Chinoda	С раствором свинца ацетата	С реактивом Вильсона
1	Спиртовое извлечение из травы пустырника	+	+	+	-
2	Водное извлечение из травы пустырника	-	-	+	-
3	Настойка пустырника	+	+	+	+

Примечание: «+» – положительный результат реакции;
«–» – отрицательный результат реакций.

Результаты реакций показали присутствие в пробах 1 и 3 флавоноидов, в том числе флавонолов и флавонол-3-гликозидов и флавоноидов, содержащих орто-гидроксильные группы. Однако реакция с ацетатом свинца не является достаточно специфичной, а реакция с реактивом Вильсона дает положительный результат только с настойкой пустырника, поэтому универсальными методами подтверждения присутствия флавоноидов в рамках сквозной стандартизации могут служить общегрупповая реакция с алюминия хлоридом и проба *Chinoda*.

При разработке методики определения суммы флавоноидов в траве пустырника подбирали оптимальные параметры, такие как концентрация спирта, соотношение сырья и экстрагента, время экстракции, время реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом, соотношение количества извлечения и 5% раствора алюминия хлорида. Результаты представлены в таблицах 2–5.

Таблица 2.

Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из травы пустырника (n=5; P=0,95)

Концентрация спирта этилового, %	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстрагирования, мин	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %
Экстрагент			
30	3:100	20	0,12±0,01
40			0,15±0,02
50			0,16±0,01
60			0,18±0,03
70			0,23±0,02
80			0,20±0,02
Соотношение сырье : экстрагент			
70	1:100	20	0,22±0,01
	2:100		0,22±0,02
	3:100		0,23±0,01
	4:100		0,19±0,03
	5:100		0,20±0,03
Время экстрагирования			
70	3:100	20	0,19±0,01
		30	0,20±0,03
		40	0,23±0,03
		50	0,23±0,01
		60	0,24±0,02

Таблица 3.

Влияние времени на полноту образования комплекса флавоноидов календулы с алюминия хлоридом (n=5; P=0,95)

Время	10 мин	15 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	0,12±0,02	0,14±0,03	0,16±0,01	0,22±0,01	0,23±0,01	0,23±0,01

Таблица 4.

Влияние соотношения аликвоты извлечения (2 мл) и объема 5% раствора алюминия хлорида на образование комплекса (n=5; P=0,95)

Объем раствора $AlCl_3$, мл	0,5 мл	1 мл	2 мл	3 мл
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	0,15±0,02	0,21±0,03	0,23±0,01	0,23±0,01

Спектр поглощения комплекса флавоноидов календулы с алюминия хлоридом в диапазоне длин волн 350-450 нм представлен на рисунке 1. Содержание суммы флавоноидов в траве пустырника в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье составило 0,23±0,03%.

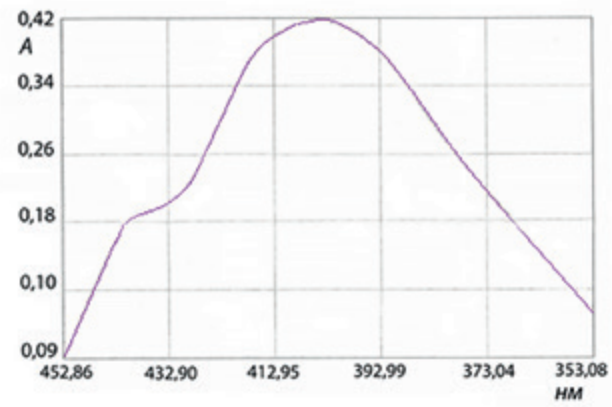


Рисунок 1. Спектр поглощения комплекса флавоноидов травы пустырника с алюминия хлоридом

Полученные данные были использованы при разработке методики определения содержания суммы флавоноидов в траве пустырника.

Методика. Навеску сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, массой около 3 г (точная навеска) помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, приливают 100 мл 70% спирта этилового, нагревают с обратным холодильником на плитке в течение 40 мин, периодически перемешивая для удаления частиц сырья со стенок колбы. Затем содержимое колбы охлаждают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки 70% спиртом этиловым (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл переносят 2 мл раствора А, добавляют 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, 2 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят до метки 70% спиртом этиловым. Через 30 мин измеряют оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов травы пустырника с алюминия хлоридом на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 403±2 нм.

В качестве раствора сравнения используют раствор, приготовленный следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 2 мл раствора А, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводят 70% спиртом этиловым до метки.

Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного раствора рутина с алюминия хлоридом. Для этого около 0,05 г (точная навеска) рутина, предварительно высушенного до постоянной массы, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта этилового с концентрацией 96%, доводят до метки (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводят до метки 96% спиртом. В качестве раствора сравнения используют 1 мл раствора А и 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, доведенные 96% спиртом в мерной колбе вместимостью 25 мл до метки.

Содержание в траве пустырника суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье (X) в % рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина; m – масса сырья, г; m_0 – масса ГСО рутина, г; W – влажность сырья, %.

Для доказательства возможности применения дифференциальной спектрофотометрии в сквозной стандартизации травы пустырника и его препаратов по содержанию суммы флавоноидов были разработаны методики для настоя и настойки пустырника.

Определение суммы флавоноидов в настойке пустырника

Предварительно в диапазоне длин волн 370–450 нм были получены абсорбционные спектры комплексов флавоноидов настойки травы пустырника с алюминия хлоридом с добавлением кислоты уксусной и без добавления (рисунки 2 и 3 соответственно). Сравнительный анализ спектров показывает, что без добавления кислоты происходят процессы диссоциации флавоноидов, так как в этом случае, помимо ос-

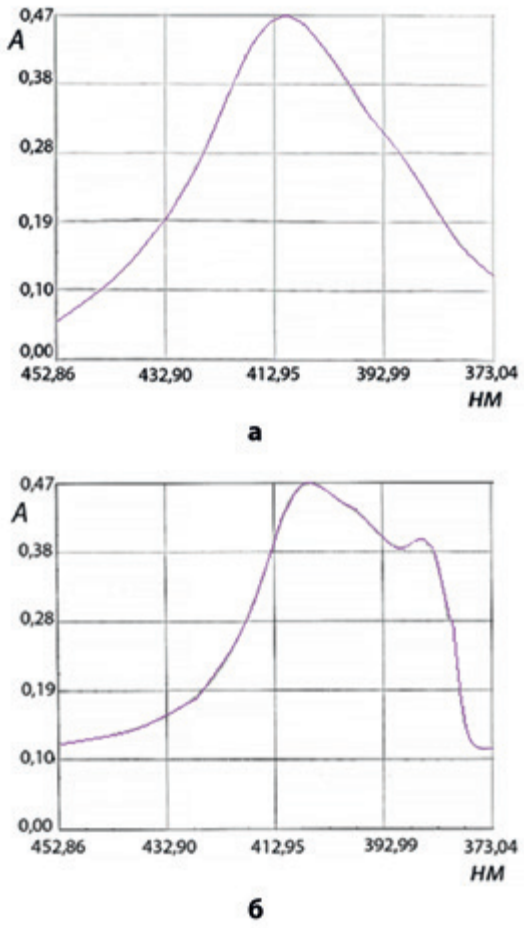


Рисунок 2. Абсорбционный спектр комплекса флавоноидов настойки пустырника с алюминия хлоридом: а – в присутствии кислоты; б – полученный без кислоты

новного максимума поглощения, присутствует «плечо». Это может свидетельствовать о том, что реакция между флавоноидами и алюминия хлоридом протекает в соотношении более чем один к одному, то есть в реакции принимают участие фенольные гидроксилы кольца В [5]. Таким образом, более рациональной является методика с добавлением кислоты. Положение максимума поглощения дифференциального спектра флавоноидов настойки пустырника с хлоридом алюминия приходится на 411±2 нм, что позволяет проводить пересчет суммы на рутин.

Методика. В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 2 мл настойки пустырника, добавляют 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, 2 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят до метки 70% спиртом этиловым. Через 40 мин измеряют оптическую плотность полученного комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 411±2 нм.

Для получения раствора сравнения в мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 2 мл настойки, добавляют 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводят до метки 70% спиртом этиловым.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в мг/мл (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 1000}{A_0 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 25},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина с алюминия хлоридом; m_0 – масса рутина в граммах.

Содержание в настойке пустырника суммы флавоноидов в пересчете на рутин составило 0,065 мг/мл. Метрологические характеристики разработанной методики представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Метрологические характеристики методики определения содержания суммы флавоноидов в настойке травы пустырника (n=5; P=0,95)

$X_{ср}$	S	S^2	±Δx	ε %
0,065	0,0011	1,25E-06	1,13E-05	1,7

Определение суммы флавоноидов в настое травы пустырника

Далее был проанализирован настой травы пустырника на возможность определения в нем флавоноидов аналогичным методом.

Настой готовили согласно инструкции по применению. Навеску сырья массой 3 г помещали в эмалированную посуду объемом 500 мл, приливали 200 мл доведенной до кипения воды и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин, затем настаивали при комнатной температуре 45 мин и фильтровали через ватно-марлевый фильтр.

При добавлении спиртового раствора алюминия хлорида к настою травы пустырника происходит выпадение осадка, что не дает возможности проведения спектрофотометрического анализа. Подбор разбавлений и соотношения объема аликвоты настоя и раствора алюминия хлорида, а также воды и спирта результатов не дали. Поэтому было решено использовать сухой алюминия хлорид и создавать кислую среду для подавления гидролиза. Также понадобилось добавление натрия ацетата для создания буферности, потому что сдвиг значения pH среды приводил к неустойчивости раствора (выпадению осадка).

В мерную колбу вместимостью 25 мл переносили 5 мл настоя, добавляли 0,2 г сухого алюминия хло-



Agilent Cary Eclipse

рида, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной, 0,2 г натрия ацетата и доводили 70% спиртом этиловым до метки (рабочий раствор). В другую мерную колбу вместимостью 25 мл переносили 5 мл настоя, 0,2 г натрия ацетата, 0,5 мл кислоты уксусной разведенной и доводили 70% спиртом этиловым до метки (раствор сравнения). Через 40 мин снимали абсорбционный спектр комплекса соединений настоя травы пустырника с алюминия хлоридом. Максимум поглощения, характерный для комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом, отсутствовал, что свидетельствовало о том, что при данных условиях получения настоя флавоноиды пустырника в воду не переходят. Однако на абсорбционном спектре присутствовал ярко выраженный максимум при длине волны 348±2 нм. При добавлении алюминия хлорида не наблюдалось пожелтение раствора. Длина волны и визуальная оценка результата протекающей в настое реакции при добавлении алюминия хлорида дает возможность предположить, что максимум поглощения обусловлен оптическими свойствами комплекса фенолкарбоновых кислот с алюминия хлоридом.

Таким образом, проведенные исследования показали, что дифференциальная спектрофотометрия для определения суммы флавоноидов может быть использована при стандартизации травы пустырника и настойки. При этом аналитическая длина волны в первом случае составляет 403±2 нм, а во втором – 411±2 нм. Обе длины волны позволяют проводить пересчет содержания флавоноидов на рутин. Флавоноиды пустырника в водное извлечение практически не переходят.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве пустырника и настойке пустырника методом дифференциальной фотометрии. Показано, что данная методика применима в сквозной стандартизации травы пустырника и его водно-спиртовых извлечений. В настое травы пустырника флавоноидная фракция достоверно не обнаружена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд., вып. 1,2 – М.: Медицина, 1987, 1990. 336 с., 400 с.
2. Д.М. Попов, Е.В. Пащинская, Л.И.Коваленко. Контроль качества сырья и препаратов пустырника спектрофотометрическим методом // Фармация. 1992. № 4. С. 27–31.
3. И.А. Самылина. Проблемы стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных средств // Традиционная медицина и питание: теоретические и практические аспекты: материалы I Международного научного конгресса. – М.: Институт традиционных методов лечения МЗ РФ, 1994. С. 254.
4. European Pharmacopoeia, 7th ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2009.
5. C.G. Heijnen. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups // Toxicol. *In Vitro*. 2001. V. 15. № 1. P. 3-6.
6. A.I. Marakhova, E.V.Sergunova, A.A.Sorokina. Theoretical and experimental approaches to the development of spectrophotometric methods of analysis of phenolic compounds in herbal raw material and preparations based on it // International journal of applied and fundamental research: электронный научный журнал. 2015. № 1. URL: http://www.science-sd.com/460-24763 (дата обращения 23.12.2015).





РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ (РУДН)

Институт биохимической технологии и нанотехнологии (ИБХТН)

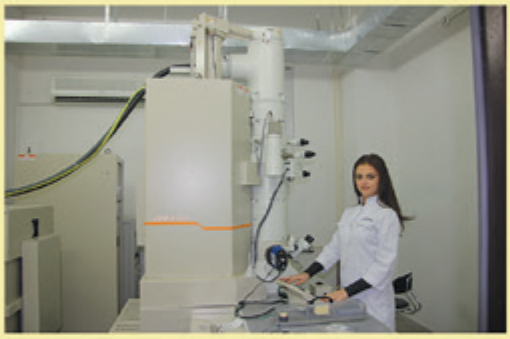
ИБХТН занимается подготовкой магистров, аспирантов и докторантов, переподготовкой и повышением квалификации научных и производственных кадров по современным образовательным программам.



ПРИГЛАШАЕМ

ВСЕХ ЖЕЛАЮЩИХ В 2016 г. ПОЛУЧИТЬ ОБРАЗОВАНИЕ ПО ПРОГРАММАМ:





МАГИСТРАТУРЫ

- Инновационные технологии и нанотехнологии в медицине, фармацевтике и биотехнологии
- Биохимические технологии и нанотехнологии

ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ПЕРЕПОДГОТОВКИ

- Наукоемкие технологии и нанотехнологии в медицине, фармацевтике и биотехнологии

ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ

- Просвечивающая электронная микроскопия. Теория и практика
- Принципы организации технологического и нанотехнологического производства в медицине и фармацевтике
- Управление интеллектуальной собственностью. Особенности патентования в сфере наукоёмких технологий и нанотехнологий
- Биоинформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования
- Нанотехнологии и биотехнологии в медицине

ДОБРО ПОЖАЛОВАТЬ!

ИБХТН оказывает широкий спектр услуг по исследованиям в области биотехнологии, химической технологии и нанотехнологии, используя современный комплекс аналитического оборудования

Адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.10/2, ком. П-9, ком. П-16

+7 (499) 936-85-99
+7 (499) 936-86-25
+7 (925) 496-80-18

nanotechnology-rudn@yandex.ru
http://nano.rudn.ru

УДК 614.272, 615.074

1 – ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

1 – Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: agentcat85@mail.ru
Тел.: 8 (499) 936 85 99

ИЗУЧЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В СБОРЕ ВИТАМИННОМ

В.Ю. Жилкина[1], А.И. Марахова[1]*, Я.М. Станишевский[1]

Резюме. В статье представлены результаты качественного анализа органических кислот в сборе поливитаминном № 2. Методом тонкослойной хроматографии установлено содержание яблочной, лимонной, аскорбиновой кислот. Количественный анализ суммы органических кислот и кислоты аскорбиновой, проведенный разработанной авторами методикой потенциометрического титрования, сопоставлен с результатами индикаторного титрования и кулонометрии. Показано преимущество использования потенциометрии для более точного установления конечной точки титрования.

Ключевые слова: потенциометрия, витаминный сбор, плоды шиповника, плоды рябины, кулонометрия, органические кислоты, кислота аскорбиновая, тонкослойная хроматография.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALISIS OF ORGANIC ACIDS IN MIXTURE OF MULTIVITAMIN RAW MATERIAL

V.Yu. Zhilkina[1], A.I. Marakhova[1]*, Ya.M. Stanishevskiy[1]

Abstract. The article presents the results of a qualitative analysis of organic acids in the mixture of the multivitamin raw material № 2. Thin layer chromatography method was confirmed to contain apple, citric and ascorbic acids. Quantitative analysis of the amount of organic acids and ascorbic acid was conducted by potentiometric titration method developed by the authors. The results were compared with the datas of the indicator titration and coulometry. The advantage of using a potentiometer to more accurately establish the endpoint was showed.

Keywords: potentiometry, the mixture of the multivitamin raw material, fructus Rosae, fructus Sorbi, coulometry, organic acids, ascorbic acid, thin layer chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время особой популярностью пользуются витаминные препараты. Витамины содержатся в большом количестве в лекарственном растительном сырье (ЛРС), преимущественно накапливаясь в плодах [1].

Особый интерес представляют поливитаминные сборы из ЛРС, обладающие витаминным действием, т.к. содержат комплекс биологически активных веществ (БАВ). При этом витамины в ЛРС присутствуют в более легко усвояемой форме, нежели в синтетических препаратах [1].

Поливитаминный сбор № 2 состоит из плодов шиповника и плодов рябины в равных соотношениях и является источником таких витаминов, как К, B_2, Р, каротиноиды. Ряд из них, например аскорбиновая кислота, переходят в настой [2, 3]. Второй группой гидрофильных соединений сбора являются органические кислоты [3]. Они участвуют в обменных процессах организма, в цикле Кребса, способствуют повышению тонуса.

Однако извлечения с кислой реакцией среды противопоказаны пациентам с гастритом и язвенной болезнью ЖКТ, что следует учитывать при назначении лекарственных средств [2].

Качество поливитаминного сбора № 2 в настоящее время нормируется нормативным документом (НД) предприятия 42-0426382103, не менявшимся с 2004 года [3]. Очевидно, что в связи с развитием инструментальной базы НД требует пересмотра.

Стандартизацию сбора логично проводить по соединениям, составляющим гидрофильную фракцию и преобладающим в ЛРС, например по аскорбиновой кислоте и сумме органических кислот, применяя современные физико-химические методы [5–8].

В связи с вышесказанным целью настоящего исследования стало качественное и количественное определение содержания суммы органических кислот и кислоты аскорбиновой в поливитаминном сборе № 2, его компонентах различными физико-химическими методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили промышленные образцы плодов шиповника (ЗАО Фирма «Здоровье»), серия Т0086, и плодов рябины (ОАО «Красногорсклексредства»), серия 34865. Настои из плодов и сбора готовились в соответствии с общей фармакопейной статьей «Настои и отвары» ГФ XI изд., вып. 2, с. 147-148. Определение pH водных извлечений проводили с помощью pH-метра SevenExcellence™ (Mettler Toledo, Германия) (ОФС «Определение pH» ГФ XI изд., вып. 1, с. 113-115). Качественное обнаружение органических кислот проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в восходящем токе растворителей (ОФС 42-0094-09 «Тонкослойная хроматография» ГФ XII изд., ч. 2) при температуре 20 °С с применением пластинок Sorbfil в системах: этилацетат – ледяная уксусная кислота (80:20) (кислота аскорбиновая) и 95% этанол – аммиак концентрированный (16:4,5) (сумма органических кислот). Стеклянная хроматографическая камера фирмы Merck, Германия. Пульверизатор для опрыскивания хроматографических пластинок, Merck, Германия. Для идентификации кислоты аскорбиновой применяли детектор 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия, а для кислот – бромкрезоловый зеленый. Количественное определение суммы органических кислот и кислоты аскорбиновой проводили титриметрическим методом с использованием индикаторов по методике, представленной в частной фармакопейной статье 38 «Плоды шиповника» ГФ XI изд., вып. 2, с. 294-297, и по ОФС 42-0114-09 «Методы количественного определения витаминов» [8]. Определение содержания свободных органических кислот методом потенциометрического титрования проводили с помощью pH-метра SevenExcellence™ (Mettler Toledo, Германия). Определение содержания суммы органических кислот проводили методом кулонометрического титрования с помощью прибора «Эксперт-006» при силе тока 5 мА. Статистическую обработку экспериментально полученных данных проводили в соответствии с требованиями ОФС 42-0111-09 «Статистическая обработка результатов эксперимента» ГФ XII изд., ч. 2, с использованием критерия Стьюдента.



pH-метр SevenExcellence™ Mettler Toiedo

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качественный анализ

Качественное обнаружение органических кислот и кислоты аскорбиновой в анализируемом ЛРС и в настоях проводилось с помощью метода тонкослойной хроматографии (ТСХ) в восходящем токе растворителей.

Хроматографирование свободных органических кислот осуществляли на пластинках Sorbfil в системе растворителей этанол 25% – аммиак конц. (16:4,5). Условия разделения хроматограммы: температура – 22 °С, время насыщения камеры – 30–40 мин. Время хроматографирования определялось временем прохождения подвижной фазы от линии старта до линии финиша (10 см).

Для обнаружения яблочной и лимонной кислот хроматограмму обрабатывали pH-зависимым детектором – бромкрезоловым зеленым. В щелочной среде детектируемые кислоты проявляются в виде желтых пятен на синем фоне.

Результат представлен на рисунке 1.

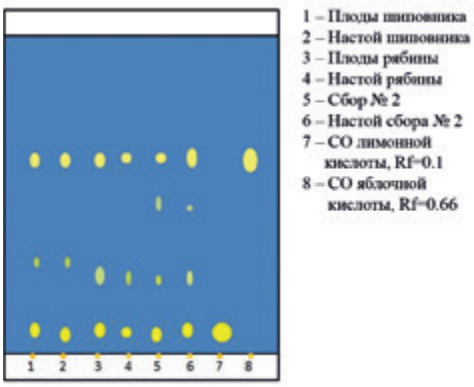


Рисунок 1. Схема хроматограммы органических кислот

Хроматографирование кислоты аскорбиновой осуществляли на пластинках Sorbfil в системе растворителей этилацетат – ледяная уксусная кислота (80:20) при температуре 22 °С. Время насыщения камеры – 30–40 мин. Время хроматографирования определялось временем прохождения подвижной фазы от линии старта до линии финиша (10 см).

Для обнаружения кислоты аскорбиновой хроматограмму обрабатывали 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. Зона кислоты аскорбиновой проявлялась в виде белых пятен на розовом фоне.

Результат хроматографирования представлен на рисунке 2.

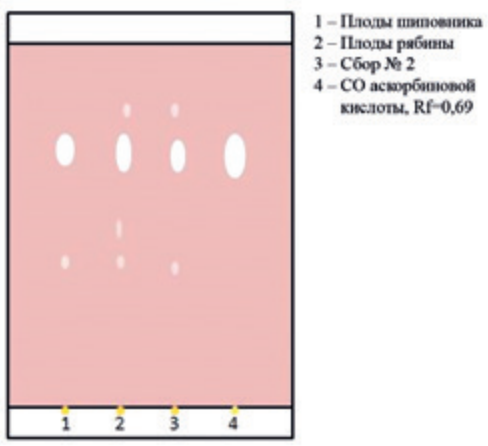


Рисунок 2. Схема хроматографирования кислоты аскорбиновой

В ходе качественного анализа было достоверно установлено присутствие кислоты аскорбиновой и органических кислот в анализируемом лекарственном растительном сырье и водных извлечениях, полученных из него.

Количественное определение кислоты аскорбиновой

Результаты по содержанию кислоты аскорбиновой в сборе поливитаминном и его компонентах, полученные титрованием с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия (2,6-ДХФИФ Na) и йодатометрическим титрованием, представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Содержание суммы кислоты аскорбиновой в плодах шиповника, рябины и в поливитаминном сборе № 2 n=5; p=0,95

Сырье	Плоды шиповника	Плоды рябины	Поливитаминный сбор № 2
Титрование 2,6-ДХФИФ Na	0,20±0,01%	0,23±0,01%	0,20±0,01%
Йодатометрия	0,18±0,04%	0,21±0,01%	0,18±0,04%

Данные таблицы 1 свидетельствуют о сходимости результатов, а следовательно, о возможности установления количества кислоты аскорбиновой в сборе поливитаминном № 2 и его компонентах йодатометрическим титрованием.

Количественное определение суммы свободных органических кислот

Потенциометрическое титрование суммы органических кислот проводили по следующей методике.

Около 25 г (точная навеска) сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещали в колбу вместимостью 250 мл, заливали 200 мл воды очищенной и выдерживали в течение 2 ч на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Затем охлаждали, фильтровали, переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводили объем извлечения водой до метки и перемешивали (раствор А).

В мерный стакан с помощью пипетки отмеряли 25 мл раствора А, опускали стеклянный и хлорсеребряный электроды, присоединенные к соответствующим клеммам на иономере. Титровали 0,1 М раствора натрия гидроксида с помощью микробюретки при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки. Фиксировали значения ЭДС и по полученным результатам строили кривые титрования в координатах pH=f(V) для определения точки эквивалентности.

Для более точного определения эквивалентного объема строили дифференциальные кривые титрования в координатах dpH/dV=f(V). Содержание свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в процентах (X) в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0{,}0067 \cdot K \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{V_a \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где 0,0067 – количество яблочной кислоты, соответствующее 1 мл раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), г; V – объем раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л), пошедшего на титрование, мл; K – поправочный коэффициент; V_a – объем извлечения, взятый на титрование, мл; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании, %; 250 – объем полученного извлечения, мл.

Интегральная и дифференциальная кривые титрования органических кислот в извлечении из сбора витаминного представлены на рисунках 3 и 4 соответственно.

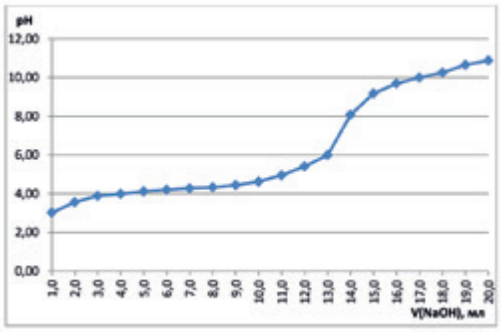


Рисунок 3. Интегральная кривая титрования извлечения витаминного сбора № 2 0,1 М раствором гидроксида натрия

Кулонометрическое титрование проводили следующим образом. В мерный стакан отмеривали 50 мл раствора электролита [100 мл насыщенного раствора K_2SO_4 доводили водой очищенной до объема 800 мл (соотношение 1:7)], после генерации гидроксид-ионов пипеткой вводилась аликвота раствора А (V_a=250 мл). Титрование проводилось гидроксид-ионами, сгенерированными на электроде.

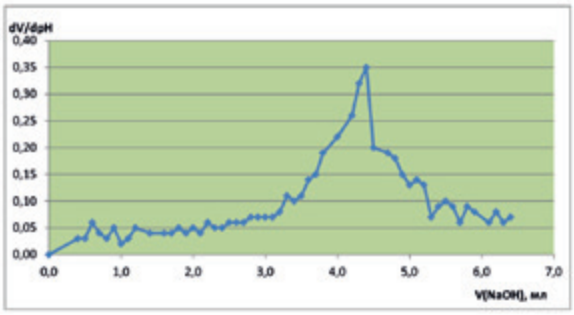


Рисунок 4. Дифференциальная кривая потенциометрического титрования извлечения витаминного сбора № 2 0,1 М раствором гидроксида натрия

Содержание свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в процентах (X) в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{x \cdot 10^{-6} \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{V_a \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где x – показания кулонометра, содержание органических кислот в пересчете на яблочную кислоту, мкг; V_a – объем извлечения, взятый на титрование, л; m – масса сырья, г; V – потеря в массе при высушивании, %; 250 – объем полученного извлечения, мл.

Результаты по содержанию суммы органических кислот в сборе витаминном № 2 и его компонентах, полученные различным методами, в сравнении с индикаторным титрованием по методике ГФ представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Содержание суммы органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в поливитаминном сборе № 2 и его компонентах n=5; p=0,95

Метод	ЛРС	Содержание суммы органических кислот в пересчете на яблочную кислоту, %
Методика ГФ	Плоды шиповника	2,87±0,01
	Плоды рябины	3,78±0,02
	Поливитаминный сбор № 2	3,06±0,02
Потенциометрия	Плоды шиповника	2,79±0,02
	Плоды рябины	3,68±0,08
	Поливитаминный сбор № 2	3,01±0,06
Кулонометрия	Плоды шиповника	2,60±0,05
	Плоды рябины	3,59±0,07
	Поливитаминный сбор № 2	3,15±0,08

Данные таблицы 2 показывают сопоставимость результатов, полученных потенциометрическим и кулонометрическим титрованием, с результатами, полученными индикаторным титрованием по методике ГФ. Потенциометрия и кулонометрия могут быть использованы при стандартизации витаминного сбора № 2 и его компонентов по показателю «содержание суммы свободных органических кислот в пересчете на яблочную кислоту». Использование индикаторов дает несколько завышенные результаты, связанные с ошибками установления конечной точки титрования из-за ее визуальной оценки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом тонкослойной хроматографии установлено содержание яблочной, лимонной, аскорбиновой кислот. Показана возможность использования йодатометрии для количественного анализа кислоты аскорбиновой. Разработана методика потенциометрического титрования суммы органических кислот и показано ее преимущество перед индикаторным титрованием. Изучена возможность кулонометрического титрования для определения суммы органических кислот в сборе витаминном № 2 и его компонентах.

ЛИТЕРАТУРА

1. С.Г. Абдуллина, Н.М. Агапова, О.А. Лира и др. Кулонометрическое определение содержания свободных органических кислот в плодах шиповника // Химико-фармацевтический журнал. 2011. Т. 45. № 5. С. 25–27.
2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987. 400 с.
3. ФСП 42-0426382103 «Сбор витаминный № 2». 2004.
4. А.И. Марахова. Применение физико-химических методов в анализе сырья лекарственных растений семейства яснотковых: автореф. дисс. … к. фарм. н. – Пермь. 2009. 24 с.
5. Е.В. Сергунова, И.А. Самылина, А.А. Сорокина. Исследования по стандартизации растительных сборов с плодами шиповника // Фармация. 2004. С. 16–17.
6. И.А. Самылина. Лекарственное растительное сырье, проблемы стандартизации // Тезисы докладов Медико-фармацевтического форума. – М. 2002. С. 133–134.
7. Н.Н. Федоровский, А.И. Марахова, А.А. Сорокина и др. Потенциометрическое титрование в анализе водных извлечений // Фармация. 2008. № 2. С. 15–16.
8. Y. Ghaemi, R. Wall. Hydrophobic chromatography with dynamically coated stationary phases // J. Chromatogr. 1979. V. 174. № 1. P. 51-59.
9. D.E. Hudhes. Titrometric determination of ascorbic acid with 2,6-dichlorphenol indophenyl in commercial liquid diets // J. Pharm. Sci. 1983. V. 72. P. 29–34.

УДК 615.453.6, 615.07:62-52

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

2 – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, 143442, Россия, Московская обл., Красногорский район, п/о Отрадное, пос. Светлые горы, владение 1

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

2 – FSBIS SCBMT FMBA, 1, pos. Svetlye gory, p/o Otradnoe, Krasnogorskiy r-n, Moscow region, 143442, Russia

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

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АВТОМАТИЗАЦИИ НА ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» НА ПРИМЕРЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «БЕТАСЕРК, ТАБЛЕТКИ 16 МГ»

Н.С. Дубовик[1], И.Е. Шохин[2]*, Л.А. Павлова[1]

Резюме. В статье приведен анализ результатов теста «Растворение», выполненного на оборудовании с ручным и автоматическим отбором проб, для препарата «Бетасерк, таблетки 16 мг». Была проведена статистическая обработка с использованием двухвыборочного F-теста для дисперсии и t-теста для независимых выборок с использованием критерия Стьюдента. Показана сопоставимость результатов теста, выполненного на ручном и автоматическом оборудовании.

Ключевые слова: тест «Растворение», таблетки, автоматизация.

EVALUATION OF THE AUTOMATION INFLUENCE ON THE DISSOLUTION VARIABILITY RESULTS FOR BETASERC TABLETS

N.S. Dubovik[1], I.E. Shohin[2]*, L.A. Pavlova[1]

Abstract. The article describes the dissolution test results for the Betaserc (betahistine) IR tablets using the equipment with manual sampling and automatic sampling. The results were compared using F-test and Student's t-test and considered to be comparable for manual and automatic dissolution equipment.

Keywords: dissolution test; tablets, automation.

ВВЕДЕНИЕ

Тест «Растворение» является незаменимым инструментом для разработки и анализа лекарственных препаратов (ЛП) в твердых дозированных лекарственных формах, при помощи которого можно осуществлять подбор оптимального состава ЛП, оценивать поведение действующего вещества при проведении сравнительных исследований *in vitro*, контролировать изменения в процессе производства, определять качество готового препарата. Тест «Растворение» применяется на протяжении всего жизненного цикла лекарственного средства: как на различных этапах фармацевтической разработки, так и при пострегистрационных изменениях [1, 2].

Выполнение теста «Растворение» на современном автоматическом оборудовании, которое, по данным зарубежной литературы, является необходимым для выполнения высококачественных исследований в соответствии с GMP, позволит существенно сократить время и затраты. Однако для того чтобы выполнять исследования на автоматическом оборудовании, необходимо проводить перенос методик теста с ранее используемого ручного оборудования с подтверждением того, что автоматизированный процесс не повлияет на вариабельность результатов высвобождения действующего вещества из ЛП [3–5].

Целью данной работы является оценка влияния автоматизации на вариабельность высвобождения действующих веществ *in vitro* из ЛП на примере препарата «Бетасерк, таблетки 16 мг».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования:

Для исследования нами был выбран лекарственный препарат (ЛП) «Бетасерк, таблетки 16 мг», приобретенный в аптечной сети г. Москвы.

На основании библиотеки данных отдела разработки лекарственных средств НИИ фармации ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова и рекомендаций общей фармакопейной статьи 1092 Фармакопеи США «Разработка и валидация теста «Растворение», где указано, что величина относительного стандартного отклонения не должна превышать 20% для первой временной точки и 10% для последующих временных точек, ЛП «Бетасерк» был отнесен к низковариабельным препаратам [6].

Оборудование:

- Прибор для проведения теста «Растворение» Agilent Technologies 708-DS Dissolution Apparatus, США (система с ручным отбором проб).
- Прибор для проведения теста «Растворение» ERWEKA GmbH HADs (Half-automated dissolution system), Германия (система с автоматическим отбором проб).



Agilent Technologies 708-DS Dissolution Apparatus

- УФ-спектрофотометр Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis, США.
- УФ-спектрофотометр Agilent Technologies 8454, США (интегрирован в систему HADs для проточного УФ-спектрофотометрического определения).
- ВЭЖХ Agilent Technologies 1200 Series с диодно-матричным детектором, США.
- Весы электронные OHAUS Discovery DV 214C, Швейцария.
- Дозатор пипеточный одноканальный с переменным объемом «Ленпипет Блэк» ДПОП-1-500-5000, Россия.
- Аппарат для фильтрации и дегазации растворов Merck Millipore (Германия), вакуумный насос XF54 230 50.
- Портативный pH-метр 728 pH lab, Metrohm AG, Швейцария.
- Магнитная мешалка MSH-300i с подогревом, 100–1250 об/мин, платформа 160 мм, Biosan, Латвия.

Все используемые в работе средства измерения зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений [7] и имели действительные свидетельства о поверке.



Полуавтоматическая система растворения ERWEKA HADs (Half-Automated Dissolution System)



УФ-спектрофотометр Agilent Technologies 8454 и УФ-спектрофотометр Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis



ВЭЖХ Agilent Technologies 1200 Series с диодноматричным детектором

Приготовление среды растворения

Фосфатный буферный раствор pH 6,8 готовили следующим образом: 11,790 г натрия фосфорнокислого 2-замещенного 12-водного и 4,609 г калия фосфата 2-замещенного вносили в мерный стакан вместимостью 1000 мл, прибавляли 400 мл воды, перемешивали с использованием магнитной мешалки в течение приблизительно 30 мин до полного растворения, затем переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводили объем раствора до метки водой и тщательно перемешивали. Измеряли pH раствора на pH-метре, при необходимости доводили pH до 6,8 раствором фосфорной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Приготовление стандартного раствора бетагистина дигидрохлорида

Около 26,66 мг (точная навеска) стандартного образца бетагистина дигидрохлорида помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и прибавляли около 70 мл среды растворения, перемешивали до полного растворения, доводили объем раствора до метки средой растворения и перемешивали. 10 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора до метки средой растворения, перемешивали.

Методика проведения теста «Растворение» на оборудовании с ручным отбором проб

Тест «Растворение» проводили согласно ОФС 42-0003-04 «Растворение» [8] на аппарате «Вращающаяся корзинка» при скорости вращения 50 об/мин при температуре 37±0,5 °С. Среда растворения – буферный раствор pH 6,8. Объем среды растворения – 900 мл. Временные точки отбора проб: 10 мин, 15 мин, 20 мин, 30 мин, 45 мин.

В каждый из 6 сосудов для растворения с 1000 мл воды, предварительно термостатированными при 37±0,5 °С, помещали по 1 таблетке исследуемого лекарственного средства. Спустя указанные промежутки времени проводили отбор 5 мл среды (для получения необходимого количества объема пробы, достаточного для анализа методом УФ-спектрофотометрии в кварцевой кювете с шириной слоя 10 мм), которые незамедлительно восполняли таким же объемом среды растворения. Отобранные пробы фильтровали через мембранные фильтры Agilent Captiva с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата (испытуемый раствор).

Методика проведения теста «Растворение» на оборудовании с автоматическим отбором проб

Тест «Растворение» проводили согласно ОФС 42-0003-04 «Растворение» [8] на аппарате «Вращающаяся корзинка» при скорости вращения 50 об/мин при температуре 37±0,5 °С. Среда растворения – буферный раствор pH 6,8. Объем среды растворения – 900 мл. Временные точки отбора проб: 10 мин, 15 мин, 20 мин, 30 мин, 45 мин.

В каждый из 6 сосудов для растворения с 1000 мл воды, предварительно термостатированными при 37±0,5 °С, помещали по 1 таблетке исследуемого лекарственного средства. Спустя указанные промежутки времени автоматически отбирались пробы в размере 1,0 мл. Восполнение объема среды также производилось автоматически.

Методика количественного определения

Количественное определение проводили методом УФ-спектрофотометрии. Измеряли оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов на спектрофотометре в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм в области максимального поглощения при длине волны 260 нм, используя в качестве раствора сравнения буферный раствор pH 6,8. В случае полуавтоматической станции количественное определение проводилось методом проточной УФ-спектрофотометрии.

Количество бетагистина дигидрохлорида (*Q%*), перешедшего в раствор, от заявленного количества рассчитывали по формуле:

$$Q\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot 10 \cdot 900 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot L \cdot 100},$$

где: *A* – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность стандартного раствора; a_0 – навеска стандартного образца бетагистина дигидрохлорида, мг; *L* – содержание бетагистина дигидрохлорида в одной таблетке, мг; *P* – содержание бетагистина дигидрохлорида в стандартном образце, %; 900 – объем среды растворения, мл; 100 – объемы мерных колб, взятых для приготовления испытуемых и стандартного растворов, мл.

Статистическую обработку результатов эксперимента осуществляли с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007 путем расчета среднего значения количества растворившейся субстанции и относительного стандартного отклонения (RSD, %).

Статистическая обработка результатов эксперимента

Статистическую обработку результатов эксперимента осуществляли с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007 путем расчета среднего значения количества растворившейся субстанции и относительного стандартного отклонения (RSD, %).

Для оценки влияния автоматизации на проведение теста «Растворение» проводили статистическую обработку, используя двухвыборочный F-тест для дисперсии и t-тест для независимых выборок с использованием критерия Стьюдента. Расчеты для двухвыборочного F-теста для дисперсии проводили с помощью программы Excel. Для дисперсионного анализа была принята нулевая гипотеза H_0: данные теста «Растворение», выполненного на ручной системе, статистически тождественны данным теста, выполненного на автоматической системе. Расчеты для t-теста проводились с помощью автоматического расчета t-критерия Стьюдента на сайте http://www.psychol-ok.ru.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Индивидуальные и усредненные значения количества бетагистина дигидрохлорида, высвободившегося в раствор из ЛП «Бетасерк, таблетки 16 мг» при проведении теста «Растворение» на оборудовании с ручным отбором проб, приведены в таблице 1. Усредненный профиль растворения исследуемого ЛП представлен на рисунке 1.

Индивидуальные и усредненные значения количества бетагистина дигидрохлорида, высвободившегося из исследуемого ЛП при проведении теста «Растворение» на оборудовании с автоматическим отбором проб, приведены в таблице 2. Усредненный профиль растворения исследуемого ЛП представлен на рисунке 2.

Таблица 1.

Индивидуальные и усредненные значения бетагистина дигидрохлорида, высвободившегося в раствор из ЛП «Бетасерк, таблетки 16 мг»

№ пробы	10 мин	15 мин	20 мин	30 мин	45 мин
1	92,14	94,50	93,83	93,83	93,83
2	95,51	98,55	98,89	97,20	97,54
3	88,76	92,81	94,50	95,18	95,85
4	92,14	94,16	93,15	94,16	94,50
5	95,85	99,23	99,23	97,88	98,21
6	89,78	93,49	94,84	96,19	95,85
Среднее, %	92,36	95,46	95,74	95,74	95,96
RSD, %	3,13	2,86	2,75	1,71	1,76

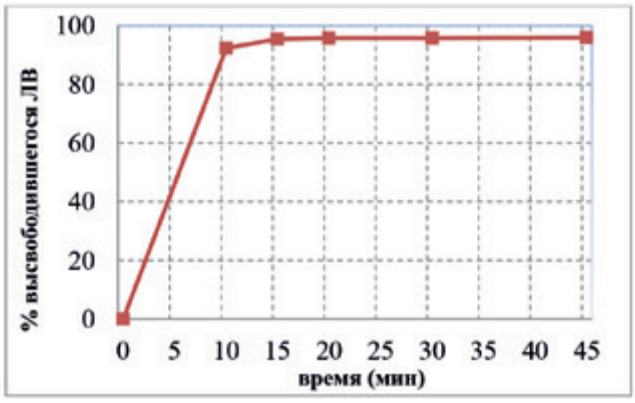


Рисунок 1. Усредненный профиль растворения ЛП «Бетасерк, таблетки 16 мг»

Таблица 2.

Индивидуальные и усредненные значения бетагистина дигидрохлорида, высвободившегося в раствор из ЛП «Бетасерк, таблетки 16 мг»

№ пробы	10 мин	15 мин	20 мин	30 мин	45 мин
1	96,33	92,99	93,90	97,55	101,20
2	103,02	98,16	96,03	96,94	99,07
3	88,74	99,98	93,30	97,55	104,96
4	90,56	94,51	96,64	104,24	97,85
5	82,96	94,21	91,17	96,64	97,25
6	86,61	94,81	89,34	100,28	100,59
Среднее, %	91,37	95,78	93,40	98,87	100,15
RSD, %	7,91	2,81	2,99	2,97	2,80

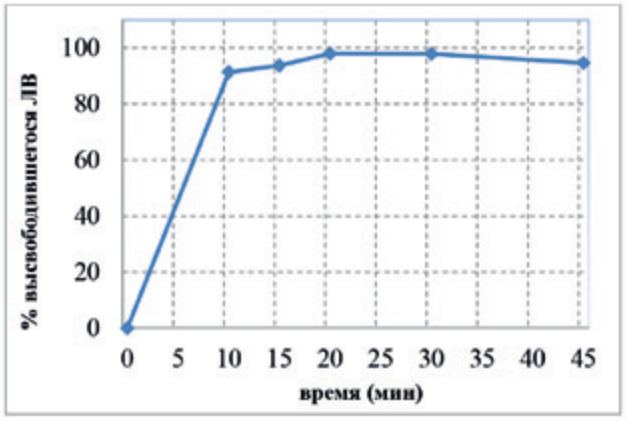


Рисунок 2. Усредненный профиль растворения ЛП «Бетасерк, таблетки 16 мг»

Значения, полученные при проведении статистической обработки результатов теста «Растворение», выполненного на оборудовании с ручным и автоматическим отбором проб, представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Значения, полученные при проведении статистической обработки с использованием двухвыборочного F-теста для дисперсии и t-теста (критерий Стьюдента) для ЛП «Бетасерк, таблетки 16 мг»

Временная точка, мин	$F_{крит}$	$F_{эмп}$	$t_{крит}$	$t_{эмп}$
10	5,05	6,24	2,23 (для $P \le 0,05$), 3,17 (для $P \le 0,01$)	0,3
15	5,05	1,88	2,23 (для $P \le 0,05$), 3,17 (для $P \le 0,01$)	0,9
20	5,05	8,11	2,23 (для $P \le 0,05$), 3,17 (для $P \le 0,01$)	0,7
30	5,05	12,8	2,23 (для $P \le 0,05$), 3,17 (для $P \le 0,01$)	0,9
45	5,05	12,66	2,23 (для $P \le 0,05$), 3,17 (для $P \le 0,01$)	0,5

На всех временных точках, за исключением второй, $F_{крит} < F_{эмп}$, $t_{эмп}$ на всех точках находится в зоне незначимости.

По результатам статистической обработки данных исследования теста «Растворение», проведенного на ручной и автоматической системах, для препарата «Бетасерк, таблетки 16 мг» с помощью двухвыборочного F-теста для дисперсии и t-теста для независимых выборок с использованием критерия Стьюдента установлено, что данные, полученные при проведении теста на ручной системе, и данные, полученные при проведении теста на автоматической системе, статистически тождественны по среднему значению и дисперсии (на уровне значимости α=0,05).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения теста «Растворения» на оборудовании с ручным и автоматическим отбором проб нами была подтверждена вариабельность высвобождения действующего вещества из ЛП «Бетасерк, таблетки 16 мг».

По результатам подсчетов установлено, что данные, полученные при проведении теста на ручной системе, и данные, полученные при проведении теста на автоматической системе, статистически тождественны по среднему значению и дисперсии (на уровне значимости α=0,05), тем самым доказывая, что автоматизация теста «Растворение» не влияет на вариабельность результатов испытания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Z. Hua, X.Yu. Lawrence. Dissolution testing for solid oral drug products: theoretical considerations // Amer. Pharm. Rev. 2010. № 6. P. 1–4.
2. 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. 50–60.
3. Возможности фармацевтическо-технологического оборудования ERWEKA // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. Спецвыпуск «Аналитика Экспо». 2013. С. 6–10.
4. A. Iarriccio, A. Kassis, T. Patel. Increasing the Efficiency of the Dissolution Laboratory through Automation // The Review of American Pharmaceutical Business and Technology. 2011. P. 15–23.
5. J. Kretz, K.Wong-Moon. Evaluation of Automation to Increase Efficiency in the Dissolution Lab // Dissolution Technologies. 2013. V. 20. № 2. P. 33–37.
6. USP 33 – NF 28. Monograph 1092 «The Dissolution Procedure: Development and Validation».
7. Государственный реестр средств измерений. URL: http://www.fundmetrology.ru/10_tipy_si/list.aspx (дата обращения 22.09.2014).
8. Государственный стандарт качества лекарственного средства. ОФС 42-0003-04 «Растворение». – М. 2004.

F-2016



И.Л. Кнунянца
1906–1990

XI ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
с международным участием
«ХИМИЯ ФТОРА»
посвящается 110-летию со дня рождения академика И. Л. Кнунянца

Уважаемые коллеги!

ОРГКОМИТЕТ ПРИГЛАШАЕТ ВАС ПРИНЯТЬ УЧАСТИЕ В РАБОТЕ КОНФЕРЕНЦИИ



Конференция состоится **26–30 июня 2016 г.** в Москве в Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук

ЦЕЛЬ КОНФЕРЕНЦИИ – обсуждение достижений и актуальных проблем развития химии фторсодержащих соединений, выявление приоритетных направлений исследований, развитие научных и коммерческих контактов научно-исследовательских институтов и вузов с промышленными предприятиями

НАУЧНАЯ ПРОГРАММА конференции охватывает все важнейшие аспекты и общемировые тенденции развития химии и технологии соединений фтора: синтез и реакционная способность органических и неорганических соединений фтора; биологически активные фторсодержащие вещества для медицины и сельского хозяйства; фторполимеры; проблемы технологии и перспективы использования фторсодержащих веществ и материалов.

Программа включает доклады ведущих ученых о последних достижениях в химии органических и неорганических соединений фтора, о результатах исследований, которые открывают путь к созданию новых технологий. Планируется проведение круглых столов с представителями промышленности и бизнес-сообщества.

ОРГАНИЗАТОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ: ИНЭОС РАН, ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИИ И НАУК О МАТЕРИАЛАХ РАН, ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ РФ, РФФИ, АНО НИЦ ИНЭОС, ЗАО НПО «ПИМ-ИНВЕСТ»

СПОНСОРЫ:

PiM INVEST

inenergy

РФФИ Российский фонд фундаментальных исследований

ИНФОРМАЦИОННАЯ ПОДДЕРЖКА:

LAST MILE ПЕРВАЯ МИЛЯ

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ХИМИЯ И БИЗНЕС
МЕЖДУНАРОДНЫЙ ХИМИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Адрес: Россия, Москва, ул. Вавилова, 28 **Сайт:** http://fluorine.moscow/ **Телефону:** +7 (499)135-69-94

УДК 615.074

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОВЕДЕНИЮ СРАВНИТЕЛЬНОГО ТЕСТА КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ (ОБЗОР)

Д.Ю. Гребёнкин[1]*, Я.М. Станишевский[1], И.Е. Шохин[2]

1 – Институт биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 10/2

2 – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п/о Отрадное, пос. Светлые горы, владение 1

1 – Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology Peoples' Friendship University of Russia, 10/2, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – FSBIS SCBMT FMBA, 1, pos. Svetlye gory, p/o Otradnoe, Krasnogorskiy r-n, Moscow region, 143442, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: gredmitrij93@gmail.com

Резюме. В статье представлен обзор современных подходов к выполнению сравнительного теста кинетики растворения с позиций основной нормативной документации, дизайна исследования, принципов выбора условий растворения, выбора и валидации методик количественного определения, оценки результатов, а также непосредственно выполнения эксперимента. Статья отражает как отечественные, так и зарубежные взгляды на проведение сравнительного теста кинетики растворения.

Ключевые слова: тест кинетики растворения, эквивалентность, дженерики.

MODERN APPROACHES OF DISSOLUTION PROFILE TEST (REVIEW)

D.Yu. Grebenkin[1]*, Ya.M. Stanishevskiy[1], I.E. Shohin[2]

Abstract. Modern approaches of dissolution profile test were reviewed in terms of documents, research design, principles of choice of test conditions, selection and validation of assay methods, results evaluation and technique of the carrying out of experiment directly. The article reflects both Russian and foreign perspectives on dissolution profile test.

Keywords: dissolution profile test, equivalence, generic drugs.

ВВЕДЕНИЕ

Сравнительный тест кинетики растворения (СТКР) – это исследование, целью которого является установление эквивалентности профиля растворения исследуемого препарата по отношению к препарату сравнения в условиях, близких к физиологическим условиям желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1].

Следует разделять понятия СТКР и тест «Растворение». Целью СТКР является установление эквивалентности профилей растворения исследуемого препарата и препарата сравнения [1]. Целью же теста «Растворение» является оценка надлежащего качества лекарственного препарата путём определения количества действующего вещества, которое в условиях, указанных в фармакопейной статье, за определенный промежуток времени должно высвобождаться в среду растворения из твердой дозированной лекарственной формы [2].

СТКР применяется на следующих этапах жизненного цикла лекарственного препарата [1]:

- Разработка лекарственной формы. Проведение СТКР на данном этапе позволяет оценить правильность технологических решений, принятых в производстве данной лекарственной формы, и, таким образом, увеличить вероятность положительных результатов дальнейших исследований биоэквивалентности.
- Исследования биоэквивалентности. СТКР позволяет обоснованно выбрать серию лекарственного препарата для исследований биоэквивалентности.
- Государственная регистрация воспроизведённого лекарственного препарата. СТКР может являться дополнением или заменой (для дополнительных дозировок ЛС) стандартного исследования биоэквивалентности, при этом оценивается сопоставимость профилей растворения воспроизведённого препарата и препарата сравнения.
- Пострегистрационные изменения. При изменениях технологии производства, оборудования, состава лекарственной формы, смене поставщика субстанции, масштабировании производства СТКР проводится для оценки влияния данных изменений на профиль растворения получаемого препарата.
- Рутинный производственный анализ.

Отдельно необходимо отметить важную роль СТКР как дополнения к исследованиям биоэквивалентности. Известно, что скорость поступления активного фарма-

цевтического ингредиента в кровь находится в тесной зависимости от профиля растворения препарата. Особенно тесная корреляция параметров растворения и биодоступности наблюдается в случаях, когда скорость растворения сопоставима со скоростью всасывания или меньше неё, или, другими словами, когда растворение является лимитирующей стадией поступления активного фармацевтического ингредиента в кровоток [3]. Анализ архивов исследований FDA, проведенных в восьмидесятые годы прошлого века, показал, что именно особенности растворения стали причиной 80% случаев отрицательных результатов при изучении биоэквивалентности лекарственных препаратов в то время [3]. Таким образом, по нашему мнению, выполнение СТКР является необходимым этапом подготовки к исследованиям биоэквивалентности.

ПРОВЕДЕНИЕ СТКР

В Российской Федерации существует ряд документов, регулирующих проведение СТКР. Самым новым из них является «Руководство по экспертизе лекарственных средств» (том 1, 2013 г., и том 3, 2014 г.) за авторством ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России [4]. Данный документ описывает требования, предъявляемые к проведению СТКР, обработке его результатов и структуре отчётов. Существуют также методические указания «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств», приложение 4, 2008 г. [5], и документ рекомендательного характера Росздравнадзора «Методические рекомендации по изучению сравнительной кинетики растворения генерических лекарственных средств для производителей», 2010 г. [6]. На данную область исследований также распространяется действие нового документа (проект), разработанного в 2015 году, «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза» [7]. Наиболее важными зарубежными регулирующими документами являются руководства FDA [8], EMA [9] и ВОЗ [10].

При подготовке к исследованию необходимо собрать информацию о препарате по следующему минимальному списку позиций: структура молекулы активного вещества, кислотно-основные свойства, растворимость, стабильность в средах растворения, класс по БКС. Существует много способов спрогнозировать поведение молекул активного вещества в физиологических жидкостях, но именно классификация по БКС является наиболее информативной при выполнении СТКР [11].

Постановка цели

Следует чётко определиться с целью исследования, исходя из того, на какой стадии жизненного цикла находится препарат (см. выше), затем можно выбрать один из вариантов дизайна исследования, предложенных «Руководством по экспертизе лекарственных средств» (таблица 1) [4].

Отдельно также следует рассматривать дизайны исследований при масштабировании производства, пострегистрационных изменениях. Объём проводимой работы в них может варьировать в зависимости от характера изменений: от проведения теста «Растворение» в одной среде до СТКР в нескольких средах или даже исследования биоэквивалентности. Также следует отдельно рассматривать дизайны исследования для особых лекарственных форм: препаратов с отложенным высвобождением, пролонгированных лекарственных средств и ректальных суппозиториев системного действия.

Выбор референтного препарата

Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза предлагают следующие критерии при выборе референтного препарата [7]:

1) оригинальный лекарственный препарат, качество, безопасность и эффективность которого были установлены при регистрации в Евразийском экономическом союзе («утвержденный в Союзе оригинальный препарат»);

2) оригинальный лекарственный препарат, одобренный в государстве с хорошо регулируемым фармацевтическим рынком (например, Европейский союз, США) при невозможности выполнения пункта 1;

Таблица 1.

Варианты дизайна исследования СТКР в соответствии с «Руководством по экспертизе лекарственных средств»

Вариант дизайна	Исследуемый препарат	Препарат сравнения	Среды растворения
Тест «Растворение» *in vitro* как дополнение к исследованиям биоэквивалентности (7.4.2.1)	12 единиц ЛС для каждой исследуемой дозировки	12 единиц оригинального ЛС	pH 1,2; 4,5; 6,8 и среда контроля качества, если не указано иное
Тест «Растворение» *in vitro* как замена исследований биоэквивалентности для дополнительных дозировок ЛС (7.4.2.2)	12 единиц ЛС для каждой дополнительной дозировки	12 единиц ЛС дозировки, используемой в исследованиях БЭ	pH 1,2; 4,5; 6,8 и среда контроля качества, если не указано иное
Альтернативные дизайны (7.4.2.2)	12 единиц ЛС с дополнительной дозировкой (суммарная дозировка)	12 единиц ЛС дозировки, используемой в исследованиях БЭ (суммарная дозировка)	pH 1,2; 4,5; 6,8 и среда контроля качества, если не указано иное

3) воспроизведенный лекарственный препарат, зарегистрированный в рамках Союза и подтвердивший свою биоэквивалентность оригинальному лекарственному препарату (при одобрении Экспертным комитетом ЕЭК) при невозможности выполнения пунктов 1 и 2;

4) лекарственный препарат, имеющий опыт применения на территории одной из стран Союза не менее 25 лет (при одобрении Экспертным комитетом ЕЭК) при невозможности выполнения пунктов 1–3.

Выбор сред растворения

Обычно используют, если не указано иное, четыре среды: с pH 1,2; 4,5; 6,8 и среду контроля качества. Возможно использование меньшего количества сред, если среда контроля качества совпадает с одной из стандартных. В случае минимальных пострегистрационных изменений бывает достаточно одной среды [4].

Буферные растворы с pH 1,2; 4,5; 6,8 моделируют соответственно среды желудка, двенадцатиперстной кишки и тонкого кишечника – отделов ЖКТ, где происходит наиболее интенсивное растворение и всасывание лекарственного препарата. Как правило, среда с pH 1,2 готовится из натрия хлорида и 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, буферный раствор с pH 4,5 содержит уксусную кислоту и ацетат натрия, буферный раствор с pH 6,8 готовится из фосфатов натрия и калия разной степени замещённости. Европейская Фармакопея [12] и Фармакопея США [13] содержат большое разнообразие методик приготовления буферных растворов различного состава, их использование позволяет решить задачи, предполагающие замену одного раствора другим. Например, при приготовлении фосфатного буферного раствора с добавлением натрия додецилсульфата следует отдать предпочтение фосфатному буферу на основе солей натрия, а не калия, чтобы избежать образования осадка калиевой соли додецилсульфата.

ОФС «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм» в Государственной фармакопее XIII издания устанавливает верхнюю границу допустимого диапазона pH на отметке 7,8 [2]. В мировой практике используется широкий перечень разнообразных буферных растворов: от разбавленных растворов кислот до сред с pH, достигающим 12. Ряд методик FDA предполагает использование сред с показателем pH выше 7 [16]. Тем не менее обычно следует избегать значений pH, выходящих за пределы физиологического диапазона.

Состав среды контроля качества для каждой методики зависит от биофармацевтической классификации лекарственного препарата. Максимальное высвобождение веществ II и IV класса БКС достигается в кишечнике под действием желчных кислот, этот важный процесс нельзя смоделировать *in vitro* при использовании одних лишь стандартных буферных растворов (pH 1,2; 4,5 и 6,8). Большое значение в этой ситуации имеет применение ПАВ в средах растворения [14]. Чаще всего применяется натрия лаурилсульфат, но возможно также использовать твины, полисорбаты, лаурилдиметиламина оксид (ЛДАО), Тритон X, бридж-35, цетилтриметиламмония бромид и другие. Эти вещества являются в сотни раз более сильными эмульгаторами, чем желчные кислоты, поэтому содержание ПАВ рекомендуется ограничивать. В частности, растворы натрия лаурилсульфата в концентрации выше 4% не рекомендуются к использованию в качестве сред растворения [15]. Важно отметить, что среда контроля качества разрабатывается с целью в первую очередь стандартизовать лекарственный препарат, поэтому она может не быть физиологически релевантной. Ряд особенностей некоторых лекарственных препаратов, обладающих крайне низкой растворимостью, может послужить причиной для добавления в среду не только ПАВ, но и органических растворителей [16]. Физиологическая релевантность сред на сегодняшний день является предметом дискуссий [17].

Для растворения желатиновых капсул и таблеток с желатиновыми оболочками можно использовать протеолитические ферменты пепсин и панкреатин. Если в качестве среды растворения используется вода или среды с pH менее 6,8, то испытание проводится с добавлением очищенного пепсина, или, если в качестве среды используются вода и среды с pH более 6,8, испытание проводится с добавлением панкреатина.

Также средой растворения может являться вода, но её использование нежелательно по причине низкой буферной ёмкости и возможного изменения pH при растворении препарата [18].

Перед использованием среда растворения должна быть подвергнута дегазации. Чаще всего используется метод, указанный в ОФС «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм» Государственной фармакопеи XIII издания [2], – нагрев до температуры около 41 °C с немедленным фильтрованием под вакуумом через фильтр с размерами пор не более 0,45 мкм. Для дегазирования может использоваться любой другой валидированный метод удаления газов, например ультразвуковое дегазирование.

Объём среды может варьировать от 500 до 1000 мл. Температура среды в течение всего исследования должна быть 37,0±0,5 °C, что соответствует физиологической норме. В Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания была впервые введена ОФС.1.4.2.0017.15 «Растворение для трансдермальных пластырей» [2], в которой обозначена температура среды для исследования данной лекарственной формы – 32,0±0,5 °C. Зарубежные подходы к СТКР также устанавливают температуру 37 °C в качестве обязательного требования для лекарственных форм внутреннего применения и температуру 32 °C для трансдермальных лекарственных форм, но при этом позволяют использовать другие температуры: от 25 °C до 40 °C [16].

Для некоторых препаратов рекомендуется смена среды растворения в ходе анализа. Чаще всего это препараты с кишечнорастворимой оболочкой. Про-

цесс отличается переходом от кислотной стадии в среде с низким значением pH к буферной стадии с более высоким значением pH среды, что позволяет смоделировать и изучить поведение лекарственного препарата при переходе из одного отдела ЖКТ в другой.

Выбор оборудования

Для СТКР чаще всего используется стандартное оборудование и среды растворения, описанные в ведущих мировых фармакопеях (Фармакопее США, Японской Фармакопее, Европейской Фармакопее, а также ГФ XIII). На сегодняшний день наиболее полный перечень аппаратов для проведения теста «Растворение» представлен в Фармакопее США (USP), в которой описано семь типов аппаратов (таблица 1). Требования к оборудованию в ведущих мировых фармакопеях в большинстве своём гармонизированы (таблица 2) [19].

Таблица 2.

Аппараты для растворения (Фармакопея США)

Номер аппарата и название согласно Фармакопее США	Для каких лекарственных форм использование препарата наиболее обосновано
1. Вращающаяся корзинка	Твёрдые ЛФ, флотирующие (всплывающие) ЛФ, медленно распадающиеся ЛФ, гранулы
2. Лопастная мешалка	Твёрдые лекарственные формы, суспензии
3. Качающийся цилиндр*	Твёрдые лекарственные формы, гранулы
4. Проточная ячейка	Твёрдые лекарственные формы, гранулы, порошки, импланты
5. Лопасть над диском	Трансдермальные лекарственные формы, пластыри
6. Вращающийся цилиндр	Трансдермальные лекарственные формы, пластыри
7. Качающийся держатель	Твёрдые лекарственные формы, трансдермальные лекарственные формы

*Отметим, что областью применения аппарата «Качающийся цилиндр» является не рутинный анализ, а научные исследования, в которых необходимо создавать определённые гидродинамические условия или многократно сменять среду растворения.

Также применяется ряд редких аппаратов, среди которых «Жевательная машина» (Chewing Machine), описанная Европейской Фармакопеей, для анализа жевательных резинок [12]. Существует подходы, подразумевающие использование нефармакопейных аппаратов для изучения профилей растворения. Такими являются термостатируемые шейкеры, диффузионная ячейка и другие [3, 16].

Список оборудования, используемого для проведения СТКР лекарственных препаратов в России, существенно уже. Чаще всего пользуются аппаратами «Вращающаяся корзинка» (аппарат 1 согласно ГФ XIII) и «Лопастная мешалка» (аппарат 2 согласно ГФ XIII). Требования к используемому оборудованию в целом можно свести к общему перечню [2]:

- Все части аппарата, которые могут контактировать с лекарственным средством и средой растворения, должны быть химически инертными и не влиять на результаты анализа. Металлические части аппарата должны быть изготовлены из нержавеющей стали или покрыты соответствующим материалом, чтобы гарантировать отсутствие их взаимодействия со средой растворения или действующим веществом.
- Не должно быть частей аппарата или условий его сборки, которые могли бы вызвать вибрацию, движение или перемещение во время работы, кроме равномерного вращения перемешивающего устройства.
- Аппараты для растворения должны соответствовать геометрическим и техническим параметрам, предусмотренным ОФС «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм» в Государственной фармакопее XIII издания, том 2 [2].

ОФС «Растворение для твёрдых дозированных лекарственных форм» в Государственной фармакопее XIII издания, том 2, допускает использование аппаратов, описанных в зарубежных фармакопеях, основные характеристики которых должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации [2].

Выбор временных точек

Минимальное количество временных точек – три, не считая нулевой. Обычно используют следующие точки отбора проб: 10, 15, 20, 30, 45 мин, точки 15 и 30 мин являются обязательными. Получаемый профиль растворения должен завершаться либо полным высвобождением, что соответствует значению не менее 90% или фазе насыщения раствора, либо выходить на плато в силу образования насыщенного раствора. Последнее может происходить, если высвобождение лимитируется не фармацевтическими факторами, а растворимостью субстанции.

При исследованиях лекарственных форм с замедленным высвобождением берётся то количество точек, которое будет полностью описывать профиль растворения [19].

Выбор метода количественного определения и валидация методики

Для проведения СТКР применяются только валидированные методики.

Валидация СТКР концептуально схожа с валидацией любой другой аналитической методики. Она включает все стандартные характеристики: линейность, правильность, прецизионность, аналитический диапазон, специфичность, робастность. Существует ОФС «Валидация аналитических методик» в Государственной фармакопее XIII издания, регламентирующая

определение данных показателей [2]. Основными документами в области СТКР, на которые следует ориентироваться при проведении валидации по данным показателям, также являются рекомендации FDA и USP [20, 21]. Следует обратить внимание на то, что критерии приемлемости тех или иных характеристик в разных источниках могут различаться. Существует также ряд валидационных характеристик, отличающих СТКР от других аналитических методов, а именно: мешающее действие компонентов-плацебо исследуемого и референсного препаратов при учёте влияния стандартных сред растворения и среды контроля качества, стабильность растворов в средах растворения, фильтрация, валидация отбора проб [19].

Для количественного определения высвободившегося в раствор активного фармацевтического ингредиента подбирается метод, удовлетворяющий всем перечисленным валидационным характеристикам. Чаще всего это спектрофотометрия и высокоэффективная жидкостная хроматография. Преимуществами спектрофотометрии являются низкая стоимость, быстрота анализа и отсутствие необходимости наличия у аналитика сложных навыков и высокой квалификации. Однако ряд серьёзных недостатков, таких как низкая селективность, низкая чувствительность и относительно высокая вариабельность результатов, существенно ограничивает перечень методик, в которых спектрофотометрический метод может быть применён; в таких случаях отдают предпочтение более универсальному и надёжному методу – высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Особенности выполнения исследования

Существенный вклад в вариабельность результатов СТКР вносит человеческий фактор [19]. Систематические и случайные ошибки работы аналитика возможно минимизировать при помощи создания максимально подробных стандартных операционных процедур и регулярных аудитов, принятия корректирующих мер. Автоматизация и частичная автоматизация оборудования также способствует минимизации человеческого фактора при отборе проб [19].

К одной из важных особенностей выполнения СТКР следует отнести вопрос о восполнении среды. Равные порции раствора отбираются из сосуда в течение всего теста, в результате чего объём среды уменьшается, а концентрация анализируемого раствора пропорционально растёт. Особенно остро эта проблема встаёт, когда в качестве метода количественного определения выбирается спектрофотометрия, так как в этом случае нужно отбирать большие порции жидкости для промывания и заполнения кювет. Необходимо либо восполнять объём изъятой среды свежей порцией, либо учитывать изменения объёма среды при расчётах. Предпочтение отдаётся варианту с восполнением среды, так как в этом случае на протяжении всего исследования сохраняется объём среды, указанный в спецификации. Однако при работе на станциях с ручным отбором проб процесс восполнения среды вручную неоднороден во времени и создаёт дополнительную вариабельность результатов, таким образом, вариант с пересчётом высвобождения на уменьшение объёма среды не теряет актуальности. В этом случае формула расчёта высвобождения активного вещества будет отличаться для каждой из временных точек отбора.

Математическая оценка результатов

Математическая оценка проводится для проверки достоверности результатов исследования и для определения эквивалентности профилей растворения.

Подтверждение достоверности результатов производится путём расчёта RSD (относительного стандартного отклонения) для показателей каждой временной точки. RSD для первой временной точки не должно превышать 20%, для остальных точек – не более 10%. Возможно несколько причин завышенного значения RSD [19]:

1. Отбирается проба в слишком ранней точке (например, 5 мин) для малорастворимого препарата. В этом случае точку можно не учитывать в расчётах эквивалентности, если она не играет значимой роли в описании профиля высвобождения.
2. Высвобождение препарата высоковариабельно, и желательно проведение испытания на более чем 12 единицах лекарственного препарата [19].

Для установления эквивалентности профилей высвобождения на основании полученных данных производят расчет фактора сходимости f_2, который позволяет оценить эквивалентность профилей растворения количественно. Расчёт производят по формуле:

$$f_2 = 50 \times \log\{[1+(1/n)\times\sum_{i=1}^{i=n}(R_i - T_i)^2]^{-0,5} \times 100\},$$

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, перешедшее в раствор из исследуемого лекарственного средства в i-й временной точке (в среднем, в процентах).

Кинетика растворения лекарственных средств считается эквивалентной в случае выполнения следующих условий:

1) значение фактора сходимости f_2 находится в интервале от 50 до 100;

2) величина относительного стандартного отклонения в случае значений первой временной точки не превышает 20%, для остальных временных точек – не превышает 10%.

Если по результатам исследования за 15 мин в раствор переходит более 85% активного фармацевтического ингредиента, результаты признаются эквивалентными без дальнейшей математической оценки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный тест кинетики растворения на сегодняшний день остаётся незаменимым инструментом исследования поведения лекарственных препаратов *in vitro*. Исследование профилей растворения важно как в качестве дополнения к исследованиям биоэквивалентности, так и в качестве альтернативы таким исследованиям.

Проблема нехватки нормативной документации, регулирующей данную область в Российской Федерации, продолжает эффективно разрешаться в последние годы благодаря появлению новых документов. В то же время отечественным исследователям по-прежнему часто приходится обращаться к нормативной документации других стран за недостающими сведениями.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.Н. Миронов, Д.П. Ромодановский, Р.Р. Ниязов, Д.В. Горячев. Экспертные подходы к планированию и анализу результатов сравнительного теста кинетики растворения воспроизведённых лекарственных препаратов в твёрдых лекарственных формах с немедленным высвобождением // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2014. № 2. С 3–8.
2. Государственная фармакопея РФ, XIII изд., Т. 2. – М. 2015. URL: http://femb.ru/feml (дата обращения 12.01.2016).
3. R. Hanson, V. Gray. Handbook on Dissolution Testing. 3rd ed. // Dissolution Technologies: Hockessin, DE. USA. 2004.
4. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. – М.: Гриф и К., 2013. 328 с., глава 7.
5. Методические указания Минздравсоцразвития России «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств», приложение 4. – М. 2008.
6. В.Г. Кукес, Г.Ф. Василенко, К.С. Давыдова, Л.М. Красных, Г.В. Раменская, А.Ю. Савченко, И.Е. Шохин. Методические рекомендации для разработчиков и производителей лекарственных средств по изучению сравнительной кинетики растворения твердых дозированных лекарственных форм. Утв. Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития. – М.: Ремедиум, 2010. 28 с.
7. Правила БЭИ. URL: http://www.eurasiancommission.org/ru/act/texnreg/deptexreg/konsultComitet/Documents/Правила БЭИ (дата обращения 17.01.2016).
8. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S. Departament of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office. 2015.
9. Guidance on the Investigation of Bioequivalence. European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). 2010.
10. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: forty-sixth report. 2011.
11. Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, А.Ю. Савченко, Ю.И. Кулинич, К.С. Давыдова. Биофармацевтическая модель оценки взаимозаменяемости воспроизведенных ЛС по их растворимости, метаболизму и элиминации (BDDCS) // Биомедицина. 2011. № 2. С. 50–57.
12. European pharmacopeia. 7th ed, V. 1. – Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe, 2012.
13. United States Pharmacopeia and National Formulary USP 36-NF 31. – Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2013.
14. Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, А.Ю. Савченко, Е.А. Волкова. Испытание «Растворение» в средах, моделирующих физиологические условия, как способ оценки поведения лекарственных средств *in vivo* // Биомедицинская химия. 2011. Т. 57. № 5. С. 482–489.
15. E. Kotzagiorgis. European Regulatory Perspective on Dissolution Testing // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Испытание «Растворение» в фармацевтической практике. Современные подходы, концепции и биофармацевтические аспекты». – М. 2011.
16. Dissolution Methods. URL: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm (дата обращения 17.01.2016).
17. K. Otsuka, Y. Shono, J. Dressman. Coupling biorelevant dissolution methods with physiologically based pharmacokinetic modeling to forecast in-vivo performance of solid oral dosage forms // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2013. Т. 65. №. 7. С. 937–952.
18. Drug Dissolution Testing: Selecting a Dissolution Medium for Solid Oral Products. URL:http://www.drug-dissolution-testing.com/blog/files/dissomedia.pdf (дата обращения 10.12.2015).
19. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. Шохина И.Е. – М.: Перо, 2015. 320 с.
20. Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation (draft). U.S. Departament of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2000.
21. USP 33-NF 28. Monograph 1092. The Dissolution Procedure: Development and Validation.

УДК 615.252

ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГУАНИДИНИЕВОЙ СОЛИ 2-АМИНОФЕНИЛСУЛЬФОКИСЛОТЫ

Е.В. Пономаренко[1]*

1 – ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, 2

1 – State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Perm State Pharmaceutical Academy» of the Ministry of health of the Russian Federation, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail:
1912ponomarenko@mail.ru
Тел.: 8 (342) 233 55 01

Резюме. Исследована противодиабетическая активность нового соединения – гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты. Обнаружен выраженный гипогликемический эффект данного соединения при введении интактным животным и животным с модельным аллоксановым диабетом, а также показано, что исследуемое соединение проявляет антиадренэргическое действие и потенцирует эффект экзогенного инсулина.

Ключевые слова: противодиабетическая активность, антиадренэргическое действие, гипогликемический эффект.

ANTIDIABETIC ACTIVITY OF GUANIDINIUM SALT 2-AMINOPHENYLACETATE

E.V. Ponomarenko[1]*

Abstract. The purpose of the real research was studying of antidiabetic activity of new products of organic synthesis – guanidinium salt 2-aminophenylacetate. It was detected a pronounced hypoglycemic effect of the compounds when administered in intact animals and animals with alloxan diabetes model, and shows that the studied compound exhibits antiadrenergic effect and potentiates the effect of exogenous insulin.

Keywords: antidiabetic activity, antiadrenergic effect, hypoglycemic effect.

ВВЕДЕНИЕ

Ароматические сульфоны – это новый класс сахароснижающих соединений. Они обнаруживают выраженный гипогликемический эффект [1], улучшают реологические свойства крови, положительно влияют на жировой обмен при длительном применении [2].

В целях дальнейшего поиска потенциальных противодиабетических лекарственных средств была изучена противодиабетическая активность одного из соединений, относящихся к данному классу, – гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты.

В качестве препаратов сравнения при определении гипогликемической активности данного соединения у животных с модельным аллоксановым диабетом были использованы пероральные противодиабетические средства: из класса бигуанидов – метформин («Сиофор», «Берлин-Хеми»), из препаратов сульфонилмочевины – гликлазид («Диабетон», «Сервье») [3]. Гуанидиниевая соль 2-аминофенилсульфокислоты является структурным аналогом гуакарбена (гуанидиниевая соль 2,4-дихлор-5-карбоксибензолсульфокислоты). Данный лекарственный препарат доказал свою клиническую эффективность [4, 5] и в 2001 году был внесен в Госреестр лекарственных средств как препарат для лечения сахарного диабета. Поэтому при изучении противодиабетической активности гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты в качестве препарата сравнения также был использован гуакарбен.

Лекарственные препараты из класса бигуанидов, как известно, не снижают уровень сахара крови у здоровых людей, а производные сульфонилмочевины проявляют гипогликемический эффект и в данных условиях. Исходя из этого, изучено влияние однократного введения гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты на уровень гликемии как у животных с модельным аллоксановым диабетом, так и у интактных животных.

Одним из существенных компонентов фармакодинамики пероральных противодиабетических средств является их способность снижать постпрандиальную гипергликемию [6]. Это имеет большое значение в первую очередь для больных сахарным диабетом 2 типа. Рафинированные углеводы вызывают у таких больных гиперинсулинемию и истощение β-клеток островковой части поджелудочной железы [7]. В связи с этим было изучено влияние гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты на изменение гликемии после нагрузки глюкозой.

Одним из механизмов противодиабетического действия бигуанидов и препаратов сульфонилмочевины является усиление гипогликемического действия экзогенного инсулина. Применение дан-

ных лекарственных средств позволяет уменьшать суточную дозу инсулина и снижает опасность возникновения резистентности [8]. В связи с этим было изучено влияние гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты на гипогликемический эффект инсулина.

Известно, что катехоламины усиливают распад гликогена и вызывают гипергликемию, их уровень на фоне сахарного диабета возрастает. Один из механизмов действия данных гормонов связан с их влиянием на β-адренорецепторы. Проявлением этого у больных может быть известное клиницистам гипогликемическое действие β-адреноблокаторов [9]. В связи с этим было проведено исследование антиадренэргической активности гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты.

Целью данной работы было изучение противодиабетической активности нового соединения из класса ароматических сульфонов – гуанадиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все опыты проведены на белых нелинейных крысах обоего пола массой 190-240 г. Все животные поступили из питомника НПО «Биомед» (сертификат качества № 121-05). Гуанидиниевая соль 2-аминофенилсульфокислоты и препараты сравнения вводились животным с модельным аллоксановым диабетом в эквитоксических дозах, равных 0,1ДЛ$_{50}$, в виде суспензии на 1% крахмальной слизи однократно через рот натощак. В контрольных сериях эксперимента вводили крахмальную слизь в эквиобъемном количестве. Для формирования модели аллоксанового диабета животным внутримышечно вводили аллоксангидрат Lachema по 170 мг/кг после суточного предварительного голодания. После формирования модели диабета животным вводили исследуемое соединение и препараты сравнения. Гипогликемическая активность гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты также изучалась у интактных крыс на фоне глюкозотолерантного теста, пробы с инсулином, а также после внутримышечного введения адреналина гидрохлорида.

Содержание глюкозы в крови животных определяли с помощью глюкозооксидазного метода. Раствор глюкозы вводили перорально однократно из расчета 2 г/кг, 0,1% раствор адреналина гидрохлорида вводили внутримышечно однократно в дозе 0,5 мг/кг, инсулин «Актрапид» вводили внутрибрюшинно однократно из расчета 0,5 ЕД/кг. При проведении глюкозотолерантного теста определяли гипергликемический коэффициент Бодуэна по формуле

$$\frac{B-A}{A},$$

где А – уровень глюкозы в крови натощак, а В – максимальная концентрация глюкозы в крови после нагрузки.

Статистическую обработку результатов проводили с вычислением среднего арифметического значения (M), средней арифметической ошибки (m), значений t и P.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что гуанидиниевая соль 2-аминофенилсульфокислоты при пероральном однократном введении животным с модельным аллоксановым диабетом проявила гипогликемический эффект, близкий гуакарбену, эффект других препаратов сравнения – метформина и гликлазида – по выраженности гипогликемического действия уступал эффекту изучаемого соединения (таблица 1).

Таблица 1.

Влияние гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты на уровень гликемии крыс с аллоксановым диабетом

Серия опытов	Уровень гликемии	
	исходный, ммоль/л	через 5 ч, %
Гуанидиниевая соль 2-аминофенилсульфокислоты	15,96±0,96	–71,2±1,6*
Контроль	16,10±1,42	–19,1±1,5
Метформин	13,66±1,27	–49,5±3,8*
Контроль	13,83±1,07	–16,9±3,3
Гликлазид	11,89±0,59	–40,5±3,6*
Контроль	11,87±0,73	–20,3±1,6
Гуакарбен	17,04±0,70	–65,30±3,0*
Контроль	16,99±0,80	–17,4±3,0

Примечание: * – достоверность отличий по сравнению с контролем при P≤0,5.

Гипогликемический эффект гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты сохраняется также при введении интактным животным, хотя у крыс с модельным аллоксановым диабетом сахароснижающее действие данного соединения превосходит гипогликемический эффект, наблюдаемый у интактных животных. Гипогликемическое действие гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты при введении интактным животным сопоставимо с действием гуакарбена, ее структурного аналога (таблица 2).

Введение раствора глюкозы животным контрольной группы вызывает быстрое повышение сахара крови: спустя час уровень глюкозы в крови животных увеличивается на 41,3%. При введении гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты наблюдается снижение гипергликемии, причем по выраженности действия в данном эксперименте изучаемое соединение превосходит препарат сравнения (таблица 3).

Таблица 2.

Влияние гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты на уровень гликемии интактных крыс

Серия опытов	Уровень гликемии, ммоль/л		Изменение гликемии, %
	0	5 ч	
Гуанидиниевая соль 2-амино-фенилсульфо-кислоты	5,00±0,22	3,21±0,15	–35,8±2,0***
Гуакарбен	5,09±0,21	3,75±0,27	–26,3±1,3**
Контроль	4,81±0,18	4,38±0,21	–8,9±2,0

Примечание: ** – достоверность отличий по сравнению с контролем при P≤0,01;
***– при P≤0,001.

Внутримышечная инъекция инсулина крысам контрольной группы в дозе 0,5 ЕД/кг вызывает быстрое снижение уровня глюкозы в крови. Через 1 ч уровень глюкозы падает на 51%, через 2 ч – на 39,5% с постепенным восстановлением исходного уровня глюкозы к концу эксперимента. Гуанидиниевая соль 2-аминофенилсульфокислоты потенцирует эффект экзогенного инсулина, при этом ее эффект в данном эксперименте также превосходит препарат сравнения (таблица 4).

Исследование антиандренэргической активности гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты показало, что изучаемое соединение сильнее, чем гуакарбен, снижает гипергликемию, вызванную введением адреналина. При этом у контрольной группы животных внутримышечное введение адреналина вызывает быстрое нарастание гликемии: уровень глюкозы в крови увеличивается на 155,2% через 2 ч.

Таблица 3.

Влияние гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты на толерантность интактных крыс к нагрузке глюкозой

Серия опытов	Уровень гликемии, ммоль/л				Изменение гликемии, %			К.Б.
	0	0–30	1 ч	2 ч	0–30	1 ч	2 ч	
Гуанидиниевая соль 2-амино-фенилсульфо-кислоты	4,37±0,19	4,19±0,17	4,46±0,20	4,48±0,21	–4,1±2,5**	+2,1±3,7*	+2,5±3,0***	5,9±1,0**
Гуакарбен	3,84±0,18	4,10±0,21	4,20±0,24	3,95±0,21	+6,8±2,5**	+9,4±1,3***	+2,9±2,7*	10,7±1,0***
Контроль	3,90±0,16	5,21±0,38	5,51±0,26	4,66±0,28	+33,6±5,7	41,3±5,7	19,5±6,8	44,8±5,3

Примечание: * – достоверность отличий по сравнению с контролем при P≤0,05;
** – при P≤0,01;
*** – при P≤0,001.

Таблица 4.

Влияние гуанидиниевой соли 2-аминофенилсульфокислоты на гипогликемический эффект инсулина у интактных крыс

Серия опытов	Концентрация глюкозы в крови, ммоль/л						
	Исх.	30 мин	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч
Гуанидиниевая соль 2-амино-фенилсульфо-кислоты	4,08±0,04	2,57±0,15	1,40±0,10	1,02±0,04	1,37±0,02	1,40±0,04	1,92±0,05
Гуакарбен	4,03±0,11	2,01±0,03	1,51±0,06	1,57±0,06	1,75±0,05	2,16±0,05	2,61±0,07
Контроль	4,10±0,06	2,55±0,15	2,01±0,04	2,48±0,12	3,32±0,18	3,98±0,17	4,39±0,20

Серия опытов	Изменение концентрации глюкозы в крови, %					
	30 мин	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч
Гуанадиниевая соль 2-амино-фенилсульфо-кислоты	–37,1±3,2	–65,7±2,1***	–75,0±0,9***	–66.4±0,4***	–65,7±0,8***	–52,9±1,0***
Гуакарбен	–50,1±1,0**	–62,5±1,6***	–61,0±1,3***	–56,6±1,5***	–46,4±1,5***	35,2±2,1***
Контроль	–37,8±3,6	–51,0±1,3	–39,5±2,9	–19,0±4,5	–2,9±4,8	+7,1±5,0

Примечание: * – достоверность отличий по сравнению с контролем при P≤0,05;
** – при P≤0,01;
*** – при P≤0,001.

Таблица 5.

Влияние гуанидиниевой соли 2-аминофенилсулфокислоты на гипергликемический эффект адреналина у интактных крыс

Серия опытов	Концентрация глюкозы в крови, ммоль/л					
	исходная	30 мин	1 ч	1,5 ч	2 ч	3 ч
Гуанидиниевая соль 2-амино-фенилсульфо-кислоты	4,13±0,11	4,42±0,13	4,80±0,14	5,10±0,13	5,47±0,13	5,79±0,16
Гуакарбен	4,21±0,14	5,28±0,20	6,17±0,16	6,81±0,13	6,79±0,15	6,15±0,13
Контроль	4,22±0,10	8,41±0,28	9,91±0,18	10,37±0,10	10,77±0,08	9,52±0,17
Серия опытов	**Изменение концентрации глюкозы в крови, %**					
	30 мин	**1 ч**	**1,5 ч**	**2 ч**	**3 ч**	**К.Б.**
Гуанидиниевая соль 2-амино-фенилсульфо-кислоты	+7,0±1,7***	+16,2±2,0***	+23,5±2,0***	+32,4±2,6***	+40,2±2,7***	40,2±2,7***
Гуакарбен	+25,4±2,9***	+46,6±4,8***	+61,8±3,2***	+61,3±2,7***	+46,1±2,8***	62,9±2,9***
Контроль	+99,3±6,8	+134,8±6,3	145,7±5,6	155,2±6,3	125,6±6,0	155,2±6,3

Примечание: * – достоверность отличий по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$;
** – при $P \leq 0,01$;
*** – при $P \leq 0,001$.

В данном эксперименте гуанидиниевая соль 2-аминофенилсульфокислоты уменьшает гипергликемический коэффициент Бодуэна по сравнению с контролем в 3,9 раза (таблица 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наши исследования показали, что новое соединение – гуанидиниевая соль 2-аминофенилсульфокислоты проявляет более выраженную гипогликемическую активность, чем метформин и гликлазид, при однократном введении животным с модельным аллоксановым диабетом в дозе, равной 0,1ДЛ$_{50}$. Гипогликемические эффекты данного соединения при пероральном введении интактным животным и животным с аллоксановым диабетом сопоставимы с таковыми эффектами гуакарбена, структурным аналогом которого является гуанидиниевая соль 2-аминофенилсульфокислоты. Вместе с тем гуанидиниевая соль 2-аминофенилсульфокислоты более эффективно сдерживает рост гликемии при введении глюкозы, исследуемое соединение проявляет более выраженный антиадренэргический эффект и значительно сильнее потенциирует гипогликемический эффект экзогенного инсулина, чем гуакарбен.

ЛИТЕРАТУРА

1. В.В. Василенко. Сахарный диабет. Место комбинированных сахароснижающих препаратов // Рус. мед. журн. 2006. Т. 14. № 6. С. 468–469.
2. О.А. Салазникова. Влияние гипогликемических средств на гемостаз и реологию крови: автореф. дисс. … к. мед. н. – Волгоград. 2001. 29 с.
3. E.A. Nyenwe, T.W. Jerkins, G.E. Umpierrez, A.E. Ki. Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes // Metab. Clin. and Experim. 2011. V. 60. P. 1–23.
4. Г.П. Дудченко. Противодиабетическая активность производных бензимидазола: автореф. дисс. … д. биол. н. – Волгоград. 2001. 35 с.
5. Патент № 2160097 РФ. Антиаллергическое и противовоспалительное средство / В.Л. Ковалева, М.Г. Плешаков, В.И. Снегоцкий, Н.И. Веселова, Л.Н. Сернов, З.И. Шрамова. 10.12.2000.
6. В.П. Котегов, М.Г. Плешаков, А.С. Закс и др. Биологическая активность и поиск химических соединений в ряду гуанидина. // Бюлл. ВНЦБАВ. 1999. № 1. С. 21–35.
7. А.С. Аметов. Инсулиносекреция и инсулинорезистентность: две стороны одной медали // Пробл. эндокринол. 2002. Т. 48. № 3. С. 31–37.
8. В.В. Липсон, В.В. Полторак, Н.И. Горбенко. Современные средства для лечения сахарного диабета типа 2: достижения и перспективы поиска. // Хим.-фарм. журнал. 1997. № 11. С. 5–8.
9. Г.Н. Алеева. Клеточные механизмы развития гипергликемии и ее фармокологическая коррекция при аллоксановом диабете (экспериментальное исследование): автореф. дисс… к.мед.н. – Казань. 2003. 20 с.

УДК 543, 544.068, 615.22, 615.45, 547, 611-018.54

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЛЬДОНИЯ, ГАММА-БУТИРОБЕТАИНА И КАРНИТИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

П.Н. Сорокоумов[1], Е.И. Савельева[1]*, Г.В. Каракашев[1], В.А. Копейкин[1], А.С. Радилов[1]

1 – ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. № 93

1 – Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal State Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency, build. 93, Kapitolovo station, G/P Kuz'molovsky, Vsevolzskiy district, Leningrad Region, 188663, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: esavelieva59@mail.ru
Тел.: 8 (812) 449 61 77 доб. 240

Резюме. Предложена методика количественного определения в рамках одной процедуры мельдония, L-карнитина и гамма-бутиробетаина в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием. В качестве внутреннего стандарта использовали изотопно-меченый d9L-карнитин. Предложен алгоритм построения градуировочных зависимостей при количественном определении содержания в плазме эндогенных соединений (L-карнитина и гамма-бутиробетаина). Методика валидирована в диапазоне концентраций от 0,05 до 20 мкг/мл для трех аналитов и применена для фармакометаболомического исследования плазмы крови при курсовом приеме мельдония как монопрепарата и в комплексе с L-карнитином.

Ключевые слова: мельдоний, L-карнитин, гамма-бутиробетаин, ВЭЖХ-МС, фармакометаболомика.

DETERMINATION OF MELDONIUM, γ-BUTYROBETAINE, AND CARNITINE IN BLOOD PLASMA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH MASS-SELECTIVE DETECTION

P.N. Sorokoumov[1], E.I. Savelieva[1]*, G.V. Karakashev[1], V.A. Kopeikin[1], A.S. Radilov[1]

Abstract. A procedure for simultaneous quantitative determination of meldonium, L-carnitine, and γ-butyrobetaine in blood plasma by high-performance liquid chromatography with mass-selective detection and the isotopically labeled d9L-carnitine as internal standard is proposed. An algorithm for constructing calibration plots for the quantitation of biogenic plasma components (L-carnitine, and γ-butyrobetaine) is developed. The procedure is validated for the concentration range from 0,05 to 20 μg/cm^3 and applied in a pharmacometabolomic study of blood plasma on protracted administration of meldonium as a monopreparation and as a complex with L-carnitine.

Keywords: medonium, L-carnitine, γ-butyrobetaine, HPLC–MS, pharmacometabolomics.

ВВЕДЕНИЕ

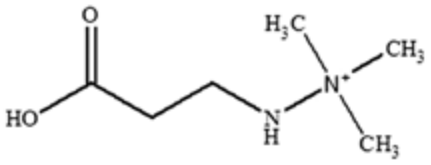
Мельдоний (3-(2,2,2-триметилгидразиния)пропионат-THP) был синтезирован И. Калвиньшем (I. Kalvinsh) в Институте органического синтеза в Латвии и первое применение нашел в качестве противоишемическго средства [1]. В настоящее время мельдоний широко применяется в клинической практике при лечении ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, абстинентного алкогольного синдрома, острых нарушений мозгового кровообращения [2, 3]. Метаболические последствия приема мельдония разнообразны и до настоящего времени исчерпывающим образом не изучены. При этом доказано, что к безусловным биологическим эффектам мельдония относится блокирование биосинтеза карнитина, его транспорта в ткани и реабсорбции почками [4]. Установлено также [5], что снижение содержания карнитина в тканях и плазме крови приводит к повышению уровня биопредшественника карнитина – гамма-бутиробетаина (рисунок 1).



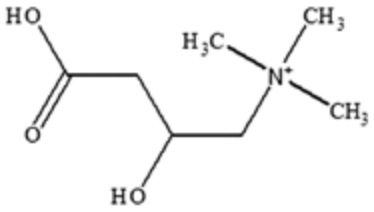
Рисунок 1. Механизм действия и биологические эффекты мельдония

В последние годы были получены данные о новых метаболических эффектах мельдония [6]. Современный уровень развития аналитической техники позволяет в рамках одной процедуры проводить мониторинг индивидуальной фармакотоксикокинетики ксенобиотика и концентраций биогенных веществ, вовлеченных в реализацию биологических эффектов от воздействия этого ксенобиотика. Исследование метаболических последствий воздействия лекарственных средств на организм человека в настоящее время рассматривается как самостоятельное направление биоаналитических исследований, именуемое фармакометаболомикой [7, 8]. Поскольку фармакологические эффекты мельдония реализуются опосредованно, в рамках терапевтического мониторинга необходимо контролировать содержание в плазме крови не только мельдония, но также L-карнитина (далее карнитина) и гамма-бутиробетаина. Три перечисленных соединения не только метаболически взаимосвязаны, но и родственны по структуре (рисунок 2), близки по физико-химическим свойствам (таблица 1), поэтому могут быть определены в рамках одной аналитической процедуры с применением единого внутреннего стандарта.

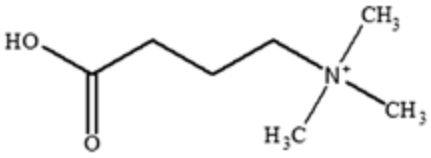
В литературе есть лишь отдельные примеры совместного определения в биожидкостях соединений,



3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионата дигидрат
(Мельдоний)



(3R)-3-гидрокси-4-триметиламмонийбутаноат
(Карнитин)



4-триметиламмонийбутаноат
(Гамма-бутиробетаин)

Рисунок 2. Структурные формулы мельдония, карнитина и гамма-бутиробетаина

представленных в таблице 1. Так, результаты совместного определения концентраций мельдония и гамма-бутиробетаина в биологических пробах приведены в работе [10]. Карнитин, как правило, определяют в биожидкостях в совокупности с ацилкарнитинами [11] в целях диагностики врожденных метаболических нарушений. Мельдоний, карнитин и гамма-бутиробетаин являются нелетучими соединениями, поэтому в качестве метода разделения при их определении используется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), причем, как правило, с масс-спектрометрическим детектированием. Последнее обстоятельство обусловлено отсутствием у них селективного максимума поглощения в ультрафиолетовой области, с одной стороны, и возможностью эффективной ионизации молекул электрораспылением, с другой стороны. При этом в доступных литературных источниках удалось обнаружить единственный пример совместного определения этих трех веществ в плазме крови. Методика совместного определения мельдония, гамма-бутиробетаина и карнитина в биологических образцах в общем виде представлена в работе [12]. В более поздних публикациях [4, 5] никаких дополнительных сведений аналитического характера не приводится, авторы ограничиваются ссылкой на уже упомянутую статью, содержащую лишь конспективное изложение методики, основанной на применении ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Метод ВЭЖХ-МС/МС, безусловно, является оптимальным выбором при проведении фармакокинетических и фармакометаболомических исследований, а также терапевтического лекарственного мониторинга, поскольку обеспечивает высочайшую чувствительность и селективность определения аналитов в сложных матрицах при минимальной пробоподготовке «dilute and shoot» («разбавить и инжектировать») [13–15]. В то же время приборы для ВЭЖХ-МС/МС-анализа дороги и пока доступны не для всех российских лабораторий.

Таблица 1.

Физико-химические характеристики аналитов [9]

Вещество	Брутто-формула	Молекулярная масса. а.е.м.	Log*P*	pKa
Мельдоний	$C_6H_{15}N_2O_2$	147,113	–2,6	3,5
Гамма-бутиробетаин	$C_7H_{16}NO_2$	146,118	–4,0	4,5
Карнитин	$C_7H_{15}NO_3$	161,105	–4,9	4,2

В работе [16] была предложена процедура количественного определения мельдония в биологических жидкостях более простым и доступным методом

ВЭЖХ-МС. Причем применение гораздо менее селективного в сравнении с ВЭЖХ-МС/МС метода не потребовало более сложной процедуры подготовки проб к анализу. Последнее важно, поскольку сложные процедуры разделения и концентрирования не только увеличивают затраты труда, реактивов и времени, но также зачастую приводят к искажению состава анализируемой пробы [15]. В то же время переход от индивидуального определения мельдония в биопробах к одновременному определению трех аналитов требует существенной модернизации методики. Основная трудность заключается в том, что карнитин и гамма-бутиробетаин являются эндогенными веществами, причем фоновые уровни их содержания в плазме крови варьируются в достаточно широких пределах [12].

В рамках настоящего исследования нами разработана ВЭЖХ-МС-методика количественного определения мельдония, карнитина и гамма-бутиробетаина в плазме крови, проведена валидация разработанной методики с использованием биообразцов, содержащих искусственные добавки аналитов, и ее апробация в биоаналитических исследованиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы, градуировочные растворы

- Мельдоний (милдронат, раствор для инъекций 500 мг/5 мл производства ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА», Россия, серия 971212, срок годности до 12.2016). [Выбор данного аптечного препарата обусловлен его доступностью, в т.ч. ценовой. Характеристики указаного продукта не влияют на качество валидации и результаты апробации методик.];
- Милдроната дигидрат [Sigma Aldrich, CAS 86426-17-71; ≥98% (HPLC)] использовали для контроля пригодности раствора для инъекций в качестве стандартного образца;
- L-карнитина гидрохлорид (Sigma Aldrich, CAS 6645-46-1);
- Стандарт гамма-бутиробетаина с содержанием основного вещества не менее 95% синтезирован в НИИ экспериментальной медицины;
- В качестве внутреннего стандарта использовали d9 (3R)-3-гидрокси-4-триметиламмонийбутаноат (Sigma Aldrich, CAS 1219386-75-0);
- Муравьиная кислота производства компании Sigma, кат. № 251364, США;
- Ацетонитрил для хроматографии фирмы «Криохром», сорт 4;
- Метанол для ВЭЖХ производства компании Merck, кат. № 1.06018.2500, Германия.

Для получения модельных проб плазмы крови с добавками аналитов использована объединенная плазма крови от десяти здоровых доноров.

Исходную смесь (ИС) определяемых веществ с концентрацией каждого компонента 2 мг/см^3 готовили в мерной колбе вместимостью 100 см^3, внося в колбу рассчитанный объем аптечного препарата мельдоний в виде раствора для инъекций и рассчитанные массы навесок гидрохлоридов гамма-бутиробетаина и карнитина с последующим доведением содержимого колбы деионизированной водой до метки. Рабочие растворы с концентрацией определяемых веществ 0,005; 0,020; 0,075; 0,25; 1,00 мг/см^3 готовили путем разбавления ИС водой.

Для получения градуировочных характеристик готовили 6 градуировочных смесей (ГС), используя в качестве матрицы бланковую плазму крови. На всех этапах валидационных испытаний методики использовали аликвотные части одной и той же бланковой плазмы. В виалы вместимостью 2 см^3, содержащие по 1 см^3 бланковой плазмы крови, вносили по 0,01 см^3 приготовленных смесей с концентрациями компонентов 0,005; 0,020; 0,075; 0,25; 1,00 и 2,00 мг/см^3. Внесенные в виалы массы определяемых компонентов составили 0,05; 0,2; 0,75; 2,5; 10 и 20 мкг. Содержимое виал перемешивали с помощью шейкера. Затем из виал отбирали по 0,2 см^3 смесей и переносили в пробирки Eppendorf вместимостью 2,0 см^3, в которые с помощью механических дозаторов вносили по 0,01 см^3 раствора дейтерированного внутреннего стандарта d9 (3R)-3-гидрокси-4-триметиламмонийбутаноата с концентрацией 0,20 мг/см^3 и по 1,0 см^3 метанола. Полученные смеси центрифугировали в течение 10 мин при 14000 об/мин. Надосадочные слои переносили в хроматографические виалы вместимостью 2 см^3, которые устанавливали в автодозатор хроматографа. Для каждой ГС было приготовлено по 3 параллельных пробы.

Для определения метрологических характеристик готовили по такой же процедуре рабочие смеси (РС) и контрольные смеси (КС), внося в 1 см^3 бланковой плазмы крови по 0,2 и 5 мкг определяемых веществ. Погрешность приготовления составила 3,5%.

Параллельно готовили холостую пробу, добавляя к 0,2 см^3 бланковой плазмы крови 0,01 см^3 раствора дейтерированного внутреннего стандарта d9-карнитина и 1,0 см^3 метанола и отбирая затем надосадочный слой после центрифугирования смеси.

Условия ВЭЖХ-МС-анализа

Использовали хроматограф жидкостный Shimadzu LC-20, оснащенный масс-селективным детектором Shimadzu LCMS-2010 EV с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении, программным обеспечением для управления и обработки дан-

ных LCMS Real Time Analysis и хроматографической колонкой Supelcosil LC-NH2 (Supelco) длиной 150 мм, диаметром 3,00 мм, с размером частиц сорбента 3,0 мкм.

- Подвижная фаза: компонент А – 0,01% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде; компонент В – ацетонитрил.
- Режим хроматографического элюирования – изократический.
- Соотношение компонентов подвижной фазы A:B – 1:9.
- Скорость потока элюента – 0,3 см^3 /мин.
- Температура термостата колонки – 35 °С.
- Температура термостата – 20 °С.
- Объем вводимой пробы – 0,005 см^3.
- Время анализа – 13 мин.

Условия работы масс-спектрометрического детектора

Масс-спектрометрический детектор – Shimadzu LCMS-2010 EV:

– Скорость потока газа-осушителя – 1,5 дм^3/мин;

– Давление на распылителе – 0,1 МПа;

– Температура газа-осушителя – 290 °С;

– Температура вспомогательного потока – 300 °С;

– Детектирование в режиме регистрации избранных (таблица 2), положительно заряженных ионов, полученных при ионизации электрораспылением при атмосферном давлении.

Таблица 2.

Времена удерживания определяемых веществ и массовые числа характеристичных ионов в их масс-спектрах

№ п/п	Времена удерживания соединения, мин	Соединение	m/z
1	4,6	Мельдоний	147
2	5,9	Карнитин	162
3		d9-карнитин	171
4	4,5	Гамма-бутиробетаин	146

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методика была валидирована с использованием плазмы крови, содержащей искусственные добавки аналитических стандартов определяемых веществ. Были определены в соответствии с РМГ61-2010 [21] линейный диапазон, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность и оценена относительная погрешность результата анализа.

Способ построения градуировочных характеристик

При разработке методик количественного определения содержания микрокомпонентов в сложных смесях в качестве градуировочных обычно используют растворы аналитов в наиболее подходящем растворителе. Тогда при обработке результатов измерений учитывается коэффициент извлечения аналитов из матрицы. Как правило, величина коэффициента извлечения считается неизменной в пределах всего линейного диапазона измерений. Лишь в отдельных методиках [17] вводятся поправочные множители, учитывающие менее эффективное извлечение аналитов из матриц в области низких концентраций. Кроме того, влияние на результаты измерений соэкстрагируемых с аналитами компонентов матрицы не учитывается вовсе, поскольку градуировочные растворы этих компонентов не содержат. Многолетний опыт исследования биологических проб в нашей лаборатории показал, что при приготовлении градуировочных растворов с использованием той же биологической среды, которая является объектом анализа, удается получить более удовлетворительные метрологические характеристики методики, поскольку градуировочные образцы и анализируемые пробы идентичны по матричному составу и претерпевают одинаковые процедуры в ходе подготовки к анализу и его проведения. Такой подход хорошо зарекомендовал себя при разработке методик определения ксенобиотиков и их метаболитов в биологических жидкостях [18–20]. Для определения концентраций эндогенных компонентов плазмы крови – карнитина и гамма-бутиробетаина – был разработан новый способ построения градуировочных характеристик.

Если матрица, используемая для приготовления градуировочных образцов, изначально содержит определяемое вещество с неизвестной концентрацией, то значения концентраций в градуировочных образцах после внесения известного количества определяемого вещества неизвестны. В этом случае с учетом линейной зависимости площади пика от концентрации аналита возможны два варианта построения градуировочной характеристики.

В первом варианте для каждого градуировочного образца откладывают экспериментальные точки со следующими координатами: величина измеренной площади аналита и введенная концентрация аналита. Получается график, не проходящий через начало координат, пересекающий ось ординат при значении Q_0 и смещенный влево по оси абсцисс на величину концентрации аналита в матрице (C_0).

Мы следовали второму варианту, при котором для построения градуировочной характеристики использовали дополнительную экспериментальную точку – величину площади пика аналита (Q_0) для холостой пробы, то есть отклик измерительной системы в виде

площади пика Q_0 на величину концентрации определяемого вещества (C_0) в матрице. В этом случае уравнение зависимости площади пика от концентрации (1) записывается в виде:

$$Q = K \cdot (C_0 + C_{введ}) = Q_0 + K \cdot C_{введ}, \quad (1)$$

где Q – измеряемая величина площади пика аналита; $C_{введ}$ – концентрация аналита, введенного в матрицу при приготовлении градуировочных образцов.

Если (1) представить в эквивалентном виде $Q - Q_0 = K \cdot C_{введ}$, то для измеряемой площади пика аналита в градуировочной пробе за вычетом площади пика аналита в холостой пробе получим линейную зависимость от концентрации аналита, введенного в градуировочный образец. Градуировочная характеристика проходит через начало координат, коэффициент чувствительности (K) определяется по методу наименьших квадратов, а концентрация аналита в исходной матрице рассчитывается по формуле:

$$C_0 = Q_0/K. \quad (2)$$

Для расчета градуировочных характеристик предварительно проводили измерения площадей пиков аналитов в плазме крови, используемой для приготовления градуировочных образцов. Статистические расчеты проводили по установленным значениям концентраций аналитов в плазме за вычетом содержания аналитов в бланковой плазме крови.

Коэффициент детерминации (R^2) для всех трех градуировочных характеристик составляет 0,999 (рисунок 3), что свидетельствует о правомерности использования линейных градуировочных характеристик в диапазоне концентраций аналитов в плазме крови от 0,05 до 20 мкг/см^3.

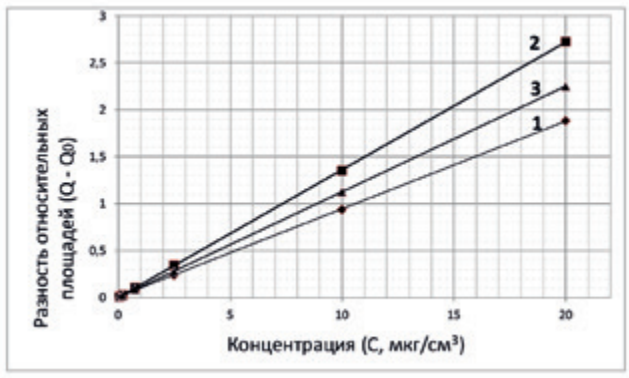


Рисунок 3. Градуировочные характеристики мельдония (1), гамма-бутиробетаина (2) и карнитина (3)

Метрологические характеристики методики

Селективность методики подтверждали методом стандартной добавки. Исследование повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики проводили в соответствии со стандартным протоколом [21]. Рассчитанные значения СКО повторяемости находятся в диапазоне от 4,0% до 7,9%. Значения t-статистики Фишера и Стьюдента, рассчитанные по результатам, полученным двумя аналитиками, составили 1,52 и 1,59 (мельдоний), 1,11 и 1,64 (гамма-бутиробетаин), 1,30 и 0,10 (карнитин) и не превышали критических (табличных) показателей.

Суммарную погрешность результата измерения концентрации (±ΔC, %) оценивали для доверительной вероятности P=0,95, учитывая погрешность повторяемости результатов ($\Delta_{повт}$) при числе измерений n=6, погрешность градуировочной характеристики ($\Delta_{гр}$) и погрешность приготовления испытательных смесей ($\Delta_{смеси}$). Величины суммарной погрешности и ее составляющих представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Значения погрешности и ее составляющих

Параметр	Мельдоний		Гамма-бутиробетаин		Карнитин	
	до 0,75 мкг/см^3	от 0,75 до 10 мкг/см^3	до 0,75 мкг/см^3	от 0,75 до 10 мкг/см^3	до 0,75 мкг/см^3	от 0,75 до 20 мкг/см^3
$\Delta_{повт}$, %	7,9	5,5	5,3	5,1	–*	4,5
$\Delta_{гр}$, % **	13	6	11	8	–	8
$\Delta_{смеси}$, %	3,5	3,5	3,5	3,5	–	3,5
ΔC, %	16	9	13	10	–	9

Примечание: * – фоновая концентрация аналита в плазме крови выше пограничного критерия;

** – приведено максимальное значение в поддиапазоне.

Результат измерения концентрации в тестовой пробе (C) представляется в виде:

$$C = C_{ср} \cdot (1 \pm \Delta C/100),$$

где $C_{ср}$ – среднее значение концентрации по результатам измерений; ΔC – суммарная погрешность при доверительной вероятности P=0,95 (таблица 3), выраженная в процентах.

Для оценки правильности измерений использовали рабочие смеси (РС), приготовленные введением в бланковую плазму крови определяемых веществ на уровне 0,2 мкг/см^3 (РС1) и 5 мкг/см^3 (РС2). Правильность результатов измерений оценивали по факту по-

падания значений концентраций, рассчитанных на основании градуировочных характеристик, в интервал допускаемых значений, определяемый суммарной погрешностью в точке измерения (таблица 4).

Таблица 4.

Значения измеренных концентраций и диапазоны допускаемых значений

Параметр	Мельдоний		Гамма-бутиробетаин		Карнитин	
	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2
Заданное значение концентрации, мкг/см^3	0,20	5,00	0,20	5,00	–*	5,00
Значение концентрации, рассчитанное по градуировочной зависимости, мкг/см^3	0,21; 0,19	4,80; 4,90	0,19; 0,21	5,10; 4,90	–	5,12; 5,10
Диапазон допускаемых концентраций в соответствии с погрешностью в точке измерения, мкг/см^3	0,17-0,23	4,5-5,5	0,17-0,23	4,5-5,5	–	4,5-5,5

Примечание: * – добавка не определяется ввиду высоких значений фоновых концентраций.

Результаты апробации методики в биоаналитическом эксперименте

Разработанная методика была использована для определения массовых концентраций мельдония, карнитина и гамма-бутиробетаина в пробах плазмы крови, полученных в ходе клинических исследований. В ходе эксперимента были измерены фоновые уровни концентраций карнитина и гамма-бутиробетаина в плазме крови 12 здоровых добровольцев, определены вариации концентрации карнитина и гамма-бутиробетаина в плазме крови в течение дня.

Пробы крови объемом не менее 5 см^3 отбирали из локтевой вены в вакуумную пробирку с антикоагулянтом ЭДТА. Сразу после отбора пробу крови центрифугировали при скорости вращения ротора 3500 об/мин в течение 15 мин для получения плазмы крови. В центрифужную пробирку вместимостью 2,0 см^3 вносили 0,2 см^3 плазмы крови, 0,01 см^3 раствора внутреннего стандарта с концентрацией 0,2 мг/см^3 и 1,0 см^3 метанола. Смесь центрифугировали в течение 10 мин при 14000 об/мин. Надосадочный слой переносили в хроматографическую виалу вместимостью 2 см^3. Аналогичную процедуру проводили параллельно и для холостого образца плазмы крови. Аликвотные части проб объемом 0,005 см^3 анализировали методом ВЭЖХ-МС. По значениям площадей хроматографических пиков с использованием градуировочных характеристик и программы обработки данных находили концентрации аналитов в плазме крови. В рамках отдельных экспериментов было установлено, что хранение плазмы в холодильнике (+4 °С) в течение суток или в морозильной камере (–20 °С) в течение месяца не оказывает влияния на результаты анализа. Получены фармакокинетические кривые мельдония, карнитина и гамма-бутиробетаина в течение курсового приёма мельдония как монопрепарата (группа М) и мельдония в сочетании с карнитином (группа М+К) (таблица 5).

На рисунке 4 представлена масс-хроматограмма экстракта плазмы крови добровольца через 2 ч после приёма мельдония в дозе 500 мг, реконструированная по ионам с массовыми числами m/z 146, 147, 162 и 171.

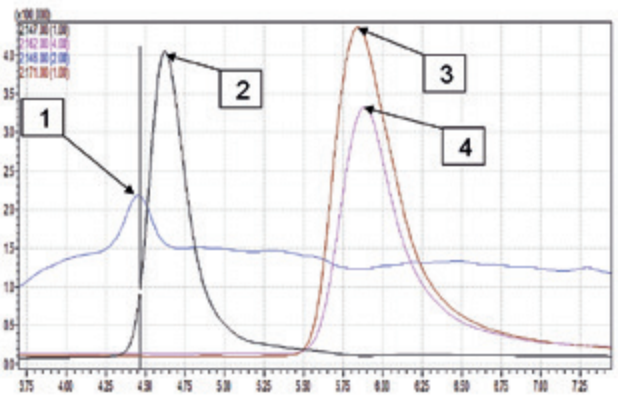


Рисунок 4. Хроматограмма экстракта плазмы крови добровольца через 2 ч после приёма мельдония; 1 – гамма-бутиробетаин, 2 – мельдоний, 3 – d9-карнитин, 4 – карнитин

На основании измеренных массовых концентраций были рассчитаны фармакокинетические параметры мельдония для добровольцев, принимавших мельдоний как монопрепарат и мельдоний в сочетании с карнитином, построены фармакокинетические кривые (рисунок 5), а также определены закономерности в изменении концентраций карнитина и гамма-бутиробетаина в плазме крови в течение курсового приёма препаратов в обеих группах добровольцев.

Как видно из рисунка 5, в целом фармакокинетические кривые мельдония для монопрепарата (М) и комплексного препарата (М+К) практически совпадают. Такой результат является неожиданным с учетом

Таблица 5.

Измеренные концентрации аналитов в плазме крови добровольцев, принимавших мельдоний (группа М) и мельдоний в сочетании с карнитином (группа М+К)

Параметр	Мельдоний		Гамма-бутиробетаин		Карнитин	
	М	М+К	М	М+К	М	М+К
Фоновое значение концентрации аналитов, мкг/см^3	–	–	0,30±0,05		7,45±0,21	
Диапазон фоновых значений концентрации аналитов, мкг/см^3	–	–	0,18–0,54		5,58-8,87	
Среднее значений концентрации аналитов при приёме препаратов в точке максимальной концентрации, мкг/см^3	9,58±0,97	9,31±0,67	0,34±0,02	0,53±0,04	9,78±0,66	11,77±1,56
Минимальное значение концентрации аналитов при приёме препаратов, мкг/см^3	–	0	0,18	0,21	5,96	6,66
Максимальное значение концентрации аналитов при приёме препаратов, мкг/см^3	11,98	12,5	0,40	0,71	11,69	19,35

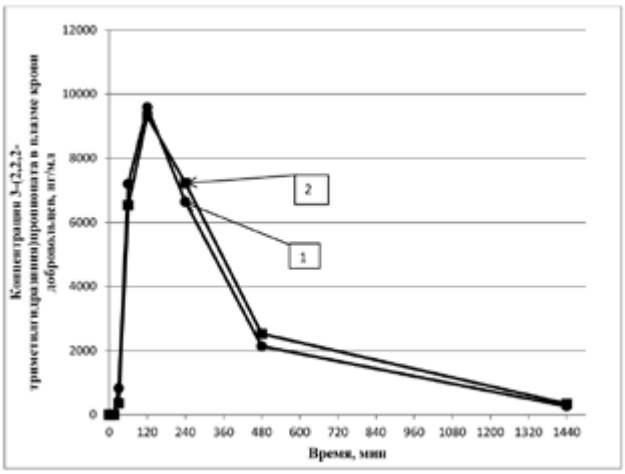


Рисунок 5. Фармакокинетические кривые мельдония для обеих групп добровольцев; 1- группа, принимавшая монопрепарат (М); 2 – группа, принимавшая комплексный препарат (М+К)

конкурентного фармакологического взаимодействия мельдония и карнитина. В то же время, как следует из таблицы 5, закономерным результатом явилось некоторое снижение концентрации карнитина в плазме крови после приема мельдония (группа М) и увеличение после приема комплексного препарата (М+К). При сравнении концентраций гамма-бутиробетаина в плазме добровольцев в первый и последний дни испытаний можно заключить, что увеличение концентрации гамма-бутиробетаина в плазме отмечается только после приёма комплексного препарата (М+К), а в группе, принимавшей только мельдоний (М), не носило такого выраженного характера (таблица 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована в диапазоне концентраций от 0,05 до 20 мкг/см^3 методика определения количественного содержания мельдония, гамма-бутиробетаина и карнитина в плазме крови с использованием дейтерированного внутреннего стандарта d9-карнитина путем депротеинизации плазмы посредством разбавления метанолом и отделения осадка центрифугированием с последующим определением аналитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием. Методика успешно использована для сравнительного исследования фармакокинетики мельдония как монопрепарата и в комплексе с карнитином, а также выявления изменений содержания гамма-бутиробетаина и карнитина в крови добровольцев, принимавших мельдоний в качестве монопрепарата и в комплексе с карнитином.

ЛИТЕРАТУРА

1. N. Sjakste, A. Gutcaits, I. Kalvinsh. Mildronate: an antiischemic drug for neurological indications // CNS Drug Rev. 2005. № 11(2). P. 151–68.
2. Н.К. Мурашко. Возможности Мельдония в кардионеврологической практике // Междунар. неврол. журн. 2012. № 4. С. 111–120.
3. Н.Ю. Семиголовский, С.Ю. Колбасов, Д.В. Лисицын, Фазылов. Повышение защитных свойств милдроната // Вестник Санкт-Петербургского Университета. Сер. 11. 2008. Прил. к вып. 1.
4. M. Makrecka et al. Mildronate, the inhibitor of l-carnitine transport, induces brain mitochondrial uncoupling and protects against anoxia-reoxygenation // European Journal of Pharmacology. 2014. V. 723. P. 55–61.
5. E. Liepinsh et al. Mildronate treatment alters γ-butyrobetaine and l-carnitine concentrations in healthy volunteers // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011. № 63. P. 1195–1201.
6. M. Dambrova et al. Meldonium decreases the diet-increased plasma levels of trimethylamine N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis // The Journal of Clinical Pharmacology. 2013. V. 53. Is. 10. P. 1095–1098.
7. R. Kaddurah-Daouk, B. Kristal, R.M. Weinshilboum. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2008. № 48. P. 653–683.
8. R. Kaddurah-Daouk, R. Weinshilboum. Pharmacometabolomics: Implications for Clinical Pharmacology and Systems Pharmacology // Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2014. № 95. P. 154–167.
9. Структурные формулы мельдония, карнитина и гамма-бутиробетаина. URL: http://www.Chemicalize.org // ChemAxon structure based predictions (дата обращения 15.12.2015).
10. F.M. Vaz et al. Analysis of carnitine biosynthesis metabolites in urine by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry // Clin. Chem. 2002. № 48 (6 Pt 1). P. 826–34.
11. P.E. Minkler et al. Quantification of carnitine and acylcarnitines in biological matrices by HPLC electrospray ionization-mass spectrometry // Clin Chem. 2008. № 4. V. 54(9). P. 1451–62.
12. M. Dambrova et al. Effect of inhibiting carnitine biosynthesis on male rat sexual performance // Physiol Behav. 2008. № 95. P. 341–347.
13. L.E. Edinboro, R.C. Backer, A. Poklis. Direct analysis of opiates in urine by liquid chromatography – tandem mass spectrometry // J. Anal. Toxicol. 2005. № 29. P. 704–710.
14. R. Dams, C.M. Murphy, W.E. Lambert, M.A. Huestis. Urine drug testing for opioids, cocaine, and metabolites by direct injection liquid chromatography/tandem mass spectrometry // Rapid Comm. Mass Spectrom. 2003. № 17. P. 1665–1670.
15. R.L. Fitzgerald et al. Dilute and shoot: analysis of drugs of abuse using selected reaction monitoring for quantification and full scan product ion spectra for identification // J Anal Toxicol. 2012. № 36(2). P. 106–11.
16. Т.Е. Морозова и др. Сравнение точности метода абсолютной градуировки и модифицированного метода последовательных стандартных добавок на примере определения 3-(2,2,2-триметилгидразиний)-пропионовой кислоты в моче в условиях нелинейности детектирования (электроспрей) // Аналитика и Контроль. 2013. Т. 17. № 2. С. 28–36.
17. А.И. Уколов, Т.И. Орлова, Е.И. Савельева, А.С. Радилов. Хроматомасс-спектрометрическое определение свободных жирных кислот в плазме крови и моче с использованием экстрактивного алкилирования // Журнал аналитической химии. 2015. Т. 70. № 9. С. 968–975.
18. Свидетельство об аттестации № 222.0183/01.00258/2012 от 02.08.2012. ФР.1.39.2012.13710. Методика измерений массовых концентраций О-алкилметилфосфонатов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием / Г.В. Каракашев, Н.В. Криворотова, Т.Е. Морозова, Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, В.А. Копейкин.
19. Свидетельство об аттестации №222.0255/01.00258/2014 от 22.10.2014. Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических веществ, реактивированных из состава аддуктов, в плазме крови методом газовой хромато-масс-спектрометрии / Е.И. Савельева, Н.Л. Корягина, В.А. Копейкин, П.Н. Сорокоумов, В.Ю. Конева.
20. Свидетельство об аттестации №222.0320/01.00258/2013 от 08.11.2013. Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов в биологических пробах методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / А.И. Уколов, Е.С. Уколова, Е.И. Савельева, П.Н. Сорокоумов, В.А. Копейкин.
21. РМГ61-2010. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. – М.: Стандартинформ, 2012.

УДК 615.015.4

1 – Первый МГМУ 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, корп. 2

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, 24/2, Kashirskoe road, Moscow, 115478, Russia

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

«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

Е.А. Егоренков[1,2]*, В.В. Смирнов[1,2]

Резюме. Проведён обзор существующих «коктейльных» методов фенотипического определения активности метаболизма, позволяющих совместно определить активность основных изоферментов системы цитохрома Р-450, а также оценена возможность использования данных методов в клинической практике для корректировки доз назначаемых препаратов с целью минимизации риска возникновения нежелательных лекарственных реакций.

Ключевые слова: цитохром Р-450, CYP, «коктейльный» метод, персонализированная медицина, рациональная фармакотерапия.

«COCKTAIL» METHODS OF CYTOCHROME P450 ISOFORMS ACTIVITY DETERMINATION *IN VIVO* USING BIOANALYTICAL METHODS: ACTUAL METHODS REVIEW AND OPPORTUNITIES OF THEIR APPLICATION IN CLINICAL PRACTICE

E.A. Egorenkov[1,2]*, V.V. Smirnov[1,2]

Abstract. The review of current «cocktail» phenotyping methods for biotransformation activity determination enabling simultaneous characterization of main cytochrome P450 isoforms activity was made. Furthermore, the possibility of their application in clinical practice in order to correct administered drugs dosage for the purpose of minimizing drug adverse reactions appearance risk was assessed.

Keywords: cytochrome P450, CYP, «cocktail» approach, personalized medicine, rational pharmacotherapy.

ВВЕДЕНИЕ

Система цитохрома Р-450 (CYP) играет важнейшую роль в метаболизме как ксенобиотиков, так и эндогенных веществ. В недавнем времени был доказан значительный вклад этой системы в метаболизм канцерогенных веществ. Важную роль CYP играет в развитии нежелательных лекарственных реакций. В частности, к возникновению таких реакций ведет межлекарственное взаимодействие, проявляющееся при совместном приёме препаратов, которые могут перекрёстно влиять на активность отдельных ферментов системы метаболизма. Помимо этого, на активность системы CYP могут влиять и другие факторы: пол, возраст, сопутствующие заболевания, пищевой рацион, общее состояние организма и прочие факторы. Существует два основных метода определения активности изоферментов цитохрома Р-450 *in vivo*: генотипирование и фенотипирование. Генотипический метод предполагает метод определения активности того или иного фермента метаболизма лекарственных средств на основании изучения его гена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1]. С помощью данного метода можно выявить мутантные аллели, производящие изоферменты с измененной активностью, и, таким образом, составить «ферментный портрет» человека на основании его генетической информации. Однако этот метод имеет ряд недостатков; в частности, генотипирование предоставляет данные об активности изоферментов лишь по генетической информации, таким образом абсолютно не учитывая условия окружающей среды, воздействующие на испытуемого [2, 3]. Фенотипический метод, в свою очередь, полностью учитывает воздействия окружающей среды на организм, и в результате возможно получить информацию о реальной активности метаболизма в данный момент времени. Метод заключается в прямом определении активности того или иного фермента метаболизма лекарствен-

ных средств по фармакокинетике его специфического субстрата (маркерного субстрата) и его метаболита [1]. К маркерному субстрату предъявляется ряд требований: он должен метаболизироваться преимущественно одним из изоферментов CYP; он должен метаболизироваться преимущественно с образованием только одного специфического метаболита; он должен быть безопасен для испытуемого (в идеале это должно быть эндогенное вещество); субстрат и его метаболит должны содержаться в биожидкостях (кровь, моча) в достаточной концентрации для количественного определения выбранным аналитическим методом.

Одним из самых современных и перспективных аналитических методов, используемых для количественного определения концентрации субстратов-маркеров и их метаболитов в биожидкостях организма при фенотипировании, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Данный метод отличается наибольшей специфичностью, точностью, чувствительностью и воспроизводимостью по сравнению с другими аналитическими методами. Однако в самых ранних работах можно обнаружить методики ВЭЖХ с использованием УФ-детектора.

Существует множество методик определения активности различных изоферментов CYP *in vivo*, использующих различные вещества в качестве субстратов-маркеров. Более того, в последнее время появляется всё больше «коктейльных» методов фенотипирования, позволяющих определить активность сразу нескольких изоферментов CYP с использованием нескольких пар «субстрат – метаболит». Такой подход требует высокой чувствительности, точности и селективности аналитического метода количественного определения исследуемых веществ в биожидкости, поэтому для этих целей лучше всего подходит метод ВЭЖХ-МС/МС, позволяющий производить эффективное хроматографическое разделение и точное совместное количественное определение исследуемых веществ даже при большом числе аналитов и их невысокой концентрации в биожидкостях.

ОСНОВНЫЕ ИЗОФЕРМЕНТЫ ЦИТОХРОМА Р-450

Цитохром Р-450 имеет множество изоформ – изоферментов, которых на данный момент выделено более 1000. Изоферменты цитохрома Р-450 по классификации D. Nebert (1987) принято разделять по близости (гомологии) нуклеотид/аминокислотной последовательности на семейства, а последние, в свою очередь, на подсемейства. Изоферменты цитохрома Р-450 с идентичностью аминокислотного состава более 40% объединены в семейства, которых выделено 36, 12 из них обнаружены у млекопитающих [1].

У каждого из изоферментов CYP своя специфическая функция в метаболических процессах и свой специфический субстрат. Несмотря не всё изобилие изоферментов, лишь несколько из них делают основной вклад в метаболизм ксенобиотиков; это изоферменты CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 и CYP2D6.

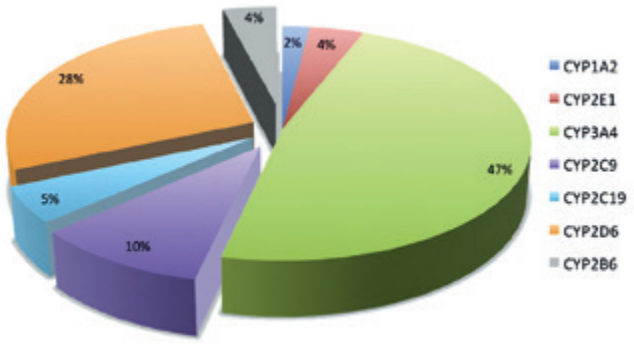


Рисунок 1. Процентное соотношение ксенобиотиков, метаболизируемых основными изоферментами цитохрома Р-450 [4]

CYP1A2 метаболизирует порядка 2–8% известных лекарственных средств и участвует в метаболической активации проканцерогенных ариламинов и гетероциклических аминов, образующихся при термической обработке пищи [5]. Является главным изоферментом метаболизма производных ксантина (теофиллин, кофеин). В качестве маркерных субстратов для фенотипирования CYP1A2 в основном используются фенацетин, кофеин и ксантин [1, 6].

CYP2C9 метаболизирует около 10-15% известных лекарственных средств. Основными субстратами данного изофермента являются многие нестероидные противовоспалительные препараты, в том числе селективные ингибиторы циклооксигеназы-2, антагонисты ангиотензиновых рецепторов, пероральные гипогликемические препараты (производные сульфонилмочевины), непрямые антикоагулянты (варфарин, аценокумарол) и др. Следует отметить, что CYP2C9 обладает стереоселективностью и метаболизирует в основном S-варфарин и S-аценокумарол, в то время как R-варфарин и R-аценокумарол метаболизируются другими изоферментами цитохрома Р-450 (CYP1A2, CYP3A4) [1, 6, 7].

CYP3A4 метаболизирует большинство известных лекарственных веществ – от 30 до 40%, в том числе блокаторы медленных кальциевых каналов, макролидные антибиотики, ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы. CYP3A4 также катализирует реакцию 6-β-гидроксилирования эндогенных стероидов, в том числе тестостерона, прогестерона, кортизола. Маркерными субстратами для определения активности CYP3A4 являются эритромицин, нифедипин, лидокаин, кортизол [1, 6].

CYP2D6 катализирует метаболизм 18–28% лекарственных веществ, в том числе нейролептиков, антидепрессантов, β-адреноблокаторов. CYP2D6 также метаболизирует некоторые наркотики: кокаин, MDMA. Для некоторых лекарственных средств окисление CYP2D6 является дополнительным путем метаболизма. Например, основным ферментом метаболизма дилтиазема является CYP3A4, в то время как CYP2D6 катализирует дополнительный путь метаболизма препарата – N-деметидезацетилирование [1, 6, 7].

«КОКТЕЙЛЬНЫЕ» МЕТОДЫ: ОСНОВНЫЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

В основе «коктейльного» метода лежит совместное количественное определение нескольких пар веществ, поэтому для успешного анализа необходимо разработать соответствующие условия пробоподготовки с целью максимально полного извлечения исследуемых объектов из биообразца. Кроме того, необходимо произвести эффективное хроматографическое разделение веществ с целью увеличения точности количественного анализа. Ниже приведены описанные в литературе «коктейльные» методы, используемые для определения активности основных изоферментов CYP *in vivo*.

Одной из самых ранних работ, описывающих «коктейльный» метод фенотипирования, является работа Bing Zhu и соавторов, опубликованная в 2001 году [8]. В данной работе перед авторами стояла задача провести разработку и валидацию «коктейльного» метода для определения активности изоферментов CYP1A2, CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4.

Исследование проводилось на 14 здоровых, некурящих добровольцах, принявших «коктейль», состоящий из 100 мг кофеина, 200 мг хлорзоксазона, 100 мг мефенитоина, 100 мг метопролола и 7,5 мг мидазолама. В качестве биообъектов использовались плазма и моча. Плазму применяли для определения активности изоферментов CYP3A, CYP2E1 и CYP1A2, мочу – для изоферментов CYP2D6 и CYP2C19. Количественное определение исследуемых веществ проводилось методом обращённо-фазной ВЭЖХ с использованием УФ-детектора.

Пары веществ-субстратов и их метаболитов извлекались из биообъектов и хроматографировались по отдельности. Так, для извлечения кофеина и его метаболита параксантина использовалась жидкостная экстракция смесью хлороформ – изопропанол (9:1). Метаболит мефенитоина извлекался из мочи диэтиловым эфиром после ферментной деконъюгации с добавлением фенобарбитала в качестве внутреннего стандарта. Хлорзоксазон и его метаболит извлекались диэтиловым эфиром после деконъюгации глюкуронидазой с добавлением фенацетина в качестве внутреннего стандарта. Метопролол и его метаболит извлекались из мочи путем ее подщелачивания до pH=5,5 с последующей экстракцией дихлорметаном с добавлением пропранолола в качестве внутреннего стандарта. Для извлечения мидазолама и его метаболита к плазме добавляли аминоуксусный буфер, после чего проводили экстракцию диэтиловым эфиром. Хроматографическое разделение проводили на разных типах колонок с разными подвижными фазами.

Недостатком данной методики является большой объем работы, связанный с пробоподготовкой и хроматографическим разделением, что не позволит использовать ее в рутинной лабораторной практике. К тому же некоторые из субстратов (в частности, хлороксазон) являются небезопасными лекарственными препаратами ввиду своих серьезных побочных эффектов.

Затем «коктейльный» метод стал набирать популярность среди ученых как метод определения активности ферментов метаболизма *in vivo*. В 2003 году был описан «коктейль» Karolinska, представляющий собой смесь кофеина в количестве 100 мг (CYP1A2), лозартана – 25 мг (CYP2C9), омепразола – 20 мг (CYP2C19), дебризохина – 10 мг (CYP2D6) и хинина – 250 мг (CYP3A4) [9]. В том же году был описан «коктейль» Cooperstown 5+1, позволяющий с помощью кофеина, декстрометорфана, омепразола, мидазолама и S-варфарина определять активность изоферментов CYP1A2, CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4 и CYP2C9 соответственно [10]. Затем, в 2004 году, была опубликована статья, в которой X. Yin и соавторы предложили использовать комбинацию кофеина (CYP1A2), толбутамида (CYP2C9), омепразола (CYP2C19), дебризокина (CYP2D6) и мидазолама (CYP3A) с целью определения активности соответствующих изоферментов *in vivo* [11]. В 2006 году был описан «коктейль» Pittsburgh, состоящий из кофеина, мефентоина, хлороксазона и флурбипрофена, для определения активности изоферментов CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 и CYP2C9 соответственно [12]. Наконец, в 2008 была опубликована одна из самых популярных «коктейльных» методик определения активности изоферментов CYP под названием Inje, использующая 93 мг кофеина (CYP1A2), 20 мг омепразола (CYP2C19), 30 мг декстрометорфана (CYP2D6), 30 мг лозартана (CYP2C9) и 2 мг мидазолама (CYP3A4) [13]. К общим недостаткам этих методов можно отнести несовместное извлечение исследуемых веществ как из плазмы, так и из мочи; затрудненную многоэтапную подготовку; использование достаточно высоких доз лекарственных веществ-маркеров (в некоторых случаях граничащих с терапевтическими), а также их относительную небезопасность. В качестве метода количественного определения в данных методиках в основном использовался метод ВЭЖХ-УФ; также в некоторых методиках применялась ВЭЖХ-МС.

В 2012 году Kyung-Suk Oh и соавторы описали созданный ими «коктейль» для определения активности

in vivo изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A, в состав которого входят 10 мг кофеина, 2 мг лозартана, 200 мкг омепразола, 2 мг декстрометорфана и 100 мг мидазолама.

В качестве биообъектов использовалась плазма крови добровольцев. Извлечение исследуемых веществ осуществлялось совместно с помощью жидкостной экстракции, которую проводили в 2 стадии: сначала проводили экстракцию этилацетатом, после отделения органического слоя оставшийся водный слой подкисляли уксусной кислотой, после чего также проводили экстракцию этилацетатом. Для количественного определения использовался метод ВЭЖХ-МС/МС. Хроматографическое разделение веществ проводилось совместно с использованием обращённо-фазной колонки C_{18} (100×2,1 мм, 3,5 мкм). Подвижная фаза двухкомпонентная – 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде и 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле; элюирование градиентное. MRM-переходы приведены для каждого из исследуемых веществ соответственно [14].

Описанный в данной статье метод пригоден для использования в клинической практике по нескольким причинам. Используемые дозировки препаратов в 10–100 раз ниже их терапевтических доз. Извлечение и количественное определение исследуемых веществ производится совместно в одной пробе, что в разы сокращает время и затраты на исследование. К недостаткам метода можно отнести инвазивность метода (используется плазма крови) и использование веществ с ограниченным оборотом в РФ (например, декстрометорфан).

Использование состава «коктейля», приведенного выше, встречается неоднократно в описанных исследованиях по определению активности изоферментов цитохрома Р-450. К примеру, несколько раньше, в 2009 году, S. Ghassabian и соавторы использовали такой же «коктейль» для определения активности метаболизма у больных шизофренией. Следует отметить, что лекарственные вещества применялись в другой дозе, а именно: 100 мг кофеина, 20 мг омепразола, 25 мг лозартана, 30 мг декстрометорфана и 2 мг мидазолама [15]. В данном методе в качестве биожидкости использовалась плазма крови. Для совместного извлечения пар дектрометорфан+декторфан, мидазолам+1′-гидроксимидазолам, омепразол+5-гидроксиомепразол и лозартан+EXP-3174 использовался метод твердофазной экстракции, для извлечения пары кофеин+параксантин использовался метод жидкостной экстракции; в обоих случаях к исследуемым образцам добавлялся раствор фенацетина в качестве внутреннего стандарта. Хроматографическое разделение и количественное определение проводилось совместно методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием колонки C_{18} (150×2,1 мм, 5,0 мкм) и смеси 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле и 0,1% раствора муравьиной кислоты в воде в качестве подвижной фазы; элюирование изократическое.

К недостаткам метода можно отнести сравнительно высокие концентрации используемых субстратов (например, доза мидазолама составляет 40% от терапевтической), сравнительно долгую пробоподготовку с использованием твердофазной экстракции и использование относительно небезопасных препаратов.

S. Tanaka и соавторы использовали такой же «коктейль» для определения активности метаболизма у здоровых добровольцев [16]. Пробоподготовка и извлечение исследуемых веществ проводилось совместно с помощью 96-луночного планшета Ostro™, который позволяет максимально очистить исследуемый образец плазмы от белков. К образцам добавлялся раствор нитразепама в качестве внутреннего стандарта. Хроматографическое разделение и количественное определение также проводилось совместно с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС. Разделение, как и в предыдущих методах, проводилось с помощью колонки C_{18}, подвижная фаза представляла собой смесь 10 мМ раствора аммония ацетата в воде и ацетонитрила; элюирование градиентное. Недостатком является неширокая распространенность пробоподготовки с использованием плейта Ostro™.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанные выше «коктейльные» методы определения активности основных изоферментов цитохрома Р-450 позволяют достаточно точно определить активность соответствующих изоферментов, однако всё же имеют ряд недостатков. Для того чтобы было возможно использовать подобный метод в рутинной клинической практике для определения активности метаболизма у каждого конкретного пациента с целью коррекции дозировок назначаемых препаратов и рационализации фармакотерапии, используемый метод должен быть быстр, точен и безопасен для пациента. Таким образом, основными характеристиками «коктейльного» метода для введения в клиническую практику являются сравнительно быстрая пробоподготовка в один этап (извлечение всех исследуемых веществ из биообъекта в одну пробу), совместное хроматографическое разделение и количественный анализ исследуемых веществ (использование высокоточных и чувствительных методов, каким является ВЭЖХ-МС/МС) и преимущественное использование мочи в качестве биообъектов и эндогенных соединений – в качестве субстратов (например, известны методики определения активности CYP3A4 с использованием в качестве субстрата-маркера кортизола и его метаболита – 6-β-гидроксикортизола [17–19], а также методики с использованием эндогенного пинолина в качестве субстрата-маркера изофермента CYP2D6 [20, 21] и др.).

ЛИТЕРАТУРА

1. В.Г. Кукес. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. – М.: Реафарм, 2004. 144 с.
2. С.Б. Середин. Лекции по фармакогенетике. – М.: МИА, 2004. 303 с.
3. Д.А. Сычев. Клиническая фармакогенетика // Клиническая фармакология / Под ред. В.Г. Кукеса. – М.: ГЕОТАР-МЕД, 2004. 156 с.
4. V.Y. Martiny, M. Miteva. Advances in Molecular Modeling of Human Cytochrome P450 Polymorphism // Journal of Molecular Biology. 2013. V. 425(21). P. 3979–3992.
5. M.C. Cornelis, A. El-Sohemy, E.K. Kabagambe, H. Campos. Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction // Journal of American Medical Assosiation. 2006. V. 295(10). P. 1135–1141.
6. Handbook of drug metabolism. 2nd ed. / Ed. by P.G. Pearson and L.C. Wienkers – Florida: CRC Press, 2008. 675 p.
7. D.F.V. Lewis, M. Dickins, P.J. Eddershaw, M.H. Tarbit, P.S. Goldfard. Cytochrome P450 Substrate Specifities, Substrate structural Templates and Enzyme Active Site Geometries // Drug metabolism and drug interctions. 1999. V. 15. P. 151.
8. B. Zhu, D.S. Ou-Yang, X.P. Chen, S.L. Huang, Z.R. Tan, N. He, H.H. Zhou. Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach // Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2001. V. 70(5). P. 61.
9. M. Christensen, K. Andersson, P. Dalen et al. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes // Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2003. V. 73. P. 517–528.
10. S. Chainuvati, A.N. Nafziger, J.S. Leeder et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome P450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the «Coopers-town 5+1 cocktail» // Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2003. V. 74. P. 437–447.
11. O.Q. Yin, S.S. Lam, C.M. Lo et al. Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies // Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2004. V. 18. P. 2921–2933.
12. N.K. Zgheib, R.F. Frye, T.S. Tracy et al. Validation of incorporating flurbiprofen into the Pittsburgh cocktail // Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2006. V. 80. V. 257–263.
13. J.Y. Ryu, I.S. Song, Y.E. Sunwoo et al. Development of the «Inje cocktail» for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms *in vivo* // Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2007. V. 82. P. 531–540.
14. K.S. Oh, S.J. Park, D.D. Shinde, J.G. Shin, D.H. Kim. High-sensitivity liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma // Journal of Chromatography B Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2012. V. 1. P. 56–64.
15. S. Ghassabian, M. Chetty, B.N. Tattam, M.C. Chem, J. Glen, J. Rahme, Z. Stankovic, I. Ramzan, M. Murray, A.J. McLachlan. A high-throughput assay using liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous in vivo phenotyping of 5 major cytochrome p450 enzymes in patients // Therapeutic Drug Monitoring. 2009. V. 31(2). P. 239–246.
16. S. Tanaka, S. Uchida, N. Inui, K. Takeuchi, H. Watanabe, N. Namiki. Simultaneous LC-MS/MS analysis of the plasma concentrations of a cocktail of 5 cytochrome P450 substrate drugs and their metabolites // Biol Pharm Bull. 2014. V. 37(1). P. 18–25.
17. В.В. Смирнов. Разработка методики определения кортизола и 6-бета-гидроксикортизола в моче с целью установления активности изофермента CYP 3A4: дисс. … к. фарм. н. – М.: ММА им. Сеченова, 2011. 95 с.
18. В.В. Смирнов, А.Ю. Савченко, Г.В. Раменская. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6-β-гидроксикортизола в моче с целью определения активности изофермента CYP 3A4 // Биомедицина. 2010. Т. 1. № 4. С. 56–60.
19. В.А. Отделёнов, В.В. Смирнов, А.В. Дмитриев, В.В. Поройков, В.В. Шумянцева, Л.М. Красных, Д.А. Сычев, В.Г. Кукес. Влияние этилметилгидроксипиридина малата на активность CYP3A4: комплексный подход к оценке влияния на систему биотрансформации лекарственных средств // Лекарственные препараты и рациональная фармакотерапия. 2013. № 3. С. 30–36.
20. Р.Х. Абдрашитов, Г.Н. Гильдеева, Г.В. Раменская, В.В. Смирнов. Обзор существующих методик оценки активности CYP2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2015. № 1. С. 4-11.
21. Д.А. Сычев, М.С. Застрожин, В.В. Смирнов, Л.М. Савченко, Е.А. Брюн, Ю.Ш. Гущина, А.С. Сорокин, А.Д. Агузаров. Ассоциация активности изофермента CYP2D6 с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих патологическим влечением к алкоголю // Вестник РГМУ. 2015. № 4. С. 32–36.

КОНФЕРЕНЦИЯ

20 апреля 2016 г.
Москва, гостиница «Холидей Инн Москва Сокольники»

«РАЗВИТИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ: СЕГОДНЯ И ЗАВТРА» ФАРМОТРАСЛЬ 2016

В ПРОГРАММЕ КОНФЕРЕНЦИИ

Стратегическая сессия:

Развитие фармацевтической отрасли России

- В фокусе лекарство:
  - Взгляд врачебного сообщества
  - Взгляд пациентского сообщества

Сессии:

Качество лекарственных средств.

- Что изменилось с введением законодательных новелл?
- Мониторинг безопасности лекарственных препаратов. Как выполнить законодательные требования?

Производство лекарственных средств

- Как работают правила надлежащей практики производства (GMP) в России? Необходимы ли корректировки?
- Организация инспектирования зарубежных производственных площадок на соответствие правилам GMP. Есть ли проблемы?

Сертификация и декларирование лекарственных препаратов. Защита населения или дополнительный барьер?

Регистрация лекарственных средств

- Законодательные изменения в системе регистрации. Взгляд производителей лекарственных средств

Круглый стол:

Регулирование и контроль фармацевтического рынка в рамках ЕАЭК

- Надлежащие практики (GxP). Что предложено изменить?
- Правила надлежащей практики производства. Правила проведения фармацевтических инспекций
- Правила маркировки лекарственных средств. Как быстро нужно перестроиться производителям
- Клинические исследования. Что нужно знать при проведении биоэквивалентности
- Номенклатура лекарственных средств ЕАЭК. Международная гармонизация
- Общее информационное поле. Что будет доступно для субъектов рынка

К УЧАСТИЮ В КОНФЕРЕНЦИИ ПРИГЛАШЕНЫ

Руководители и ведущие сотрудники Минздрава России, Минпромторга России, Росздравнадзора, Росаккредитации, экспертных учреждений, представители профессиональных отраслевых объединений, сотрудники фармацевтических компаний и др.

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

УДК 615.015.4

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИНОЛИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТА 6-ГИДРОКСИ-1,2,3,4-ТЕТРАГИДРО-БЕТА-КАРБОЛИНА С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТА CYP2D6

Р.Х. Абдрашитов[1]*, А.Е. Петухов[1,2], В.В. Смирнов[1,2]

1 – Первый МГМУ 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, корп. 2

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, 24/2, Kashirskoe road, Moscow, 115478, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: rustixxx13@gmail.com

Резюме. Разработана чувствительная методика количественного определения пинолина и его метаболита в плазме крови человека после пробоподготовки ТФЭ с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с трехквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием. Аналитический диапазон методики составляет от 250 пг/мл до 1500 пг/мл и для пинолина, и для его метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина. Разработанную методику возможно в дальнейшем использовать для определения текущего статуса активности CYP2D6.

Ключевые слова: CYP2D6, LC-MS/MS, пинолин, 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF BIOANALYTICAL METHOD FOR QUANTIFICATION OF PINOLINE AND ITS METABOLITE 6-OH-1,2,3,4-TETRAHYDROCARBOLINE FOR THE PURPOSE OF CYPD26 ACTIVITY DETERMINATION

R.K. Abdrashitov[1]*, A.E. Petukhov[1,2], V.V. Smirnov[1,2]

Abstract. A sensitive method for quantification of pinoline and its metabolite in human plasma using solid phase extraction and high performance liquid chromatography with mass-spectrometry was developed. Analytical range was 250-1500 pg/ml both for pinoline and for 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline. The developed method may be used to determine the current status of CYP2D6 activity.

Keywords: CYP2D6, LC-MS/MS, pinoline, 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline.

ВВЕДЕНИЕ

Изофермент CYP2D6 отвечает за метаболизм 20–30% лекарственных препаратов. К этим препаратам относятся трициклические антидепрессанты, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, антагонисты 5HT3-рецепторов, антипсихотики, опиаты, амфетамины, а также антагонисты β-адренорецепторов и антиаритмические средства [1]. Данные лекарственные препараты оказывают выраженное фармакологическое действие, при этом при их применении часто возникают межлекарственные взаимодействия, такие как ингибирование метаболизма нортриптилина и дезипрамина параксантином, венлафаксина дифенгидрамином, метопролола гидроксихлорохином и индукция метаболизма кодеина рифампицином. Также возникают такие нежелательные лекарственные реакции (НЛР), как периферическая нейропатия, лактатацидоз.

Среди десятков изоферментов цитохрома Р-450, которые участвуют в биотрансформации ксенобиотиков, изофермент CYP2D6 является одним из наиболее важных ферментов, осуществляющих метаболизм лекарственных средств. Изофермент в основном экспрессируется в печени, но он также локализуется в легких и сердце. Особенностью данного изофермента является его высокая межвидовая и внутривидовая вариабельность активности, причиной которой является генетический полиморфизм. Такой полиморфизм может приводить к 30–40-кратной разнице в клиренсе препаратов, что приводит к выходу концентрации из терапевтического окна как по нижней, так и по верхней границе [2]. Как следствие, такие различия в

активности CYP2D6 могут привести не только к серьезным НЛР (например, при антидепрессантной терапии), но также может наблюдаться отсутствие фармакологического эффекта (например, отсутствие анальгетического эффекта опиоидных препаратов).

Определение активности изофермента CYP2D6 позволяет оценить текущий статус метаболизма пациента. Такая оценка позволяет скорректировать терапию для улучшения фармакологического эффекта и снизить частоту возникновения НЛР.

Субстратная специфичность определенных ферментов метаболизма лекарственного средства (ЛС) позволила разработать методы их фенотипирования. Активность того или иного фермента метаболизма определяется по фармакокинетике его специфического субстрата, называемого «маркерным» субстратом, путем измерения его концентрации и концентрации его метаболита в плазме крови или в моче [3]. На основании этих данных рассчитывается так называемый метаболический индекс, равный отношению концентрации ЛС к концентрации его метаболита.

В зависимости от субстрата методы определения активности изоферментов можно разделить на две группы: инвазивные и неинвазивные. В настоящее время существует несколько инвазивных методов определения активности изофермента CYP2D6 с использованием нескольких маркерных субстратов: дебризохина, метопролола, декстрометорфана, спартеина и трамадола [4].

В инвазивных методах определения активности CYP2D6 маркерный субстрат вводится перорально или внутривенно и затем через определенное время в сыворотке или моче определяют концентрацию маркерного субстрата и его метаболита. Такие методы имеют ряд недостатков, связанных с необходимостью приема ЛС, которые являются субстратами и могут привести к развитию НЛР (например, аллергическим).

Методики по определению эндогенных веществ и их метаболитов являются более перспективными, так как позволяют оценить активность изоферментов без введения пациенту специфических «маркеров». Данные методики являются практически безопасными.

Проводится много исследований по поиску эндогенных веществ, которые метаболизируются только одним изоферментом. Широкое исследование провел A. Yu с коллегами по поиску эндогенных веществ, специфичных изоферменту CYP2D6 [5]. В своем исследовании ученые рассмотрели ряд эндогенных веществ, потенциально являющихся специфическими субстратами для CYP2D6. Было установлено, что изофермент CYP2D6 незначительно метаболизирует эндогенные фенилэтиламины (2-фенилэтиламин, октопамин, синефрин, метанефрин и норметанефрин), индолэтиламины (триптамин, серотонин, 6-метокситриптамин и мелатонин) и β-карболины (гарман, норгарман и триптолин). Однако индолметиламин [5-метокси-N,N-диметилтриптамин (5-MDMT)] и пинолин (6-метокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин) показали относительно высокое сходство к CYP2D6 и О-деметилировались только под действием CYP2D6. При добавлении к исходным веществам моноклональных антител против CYP2D6 О-деметилирование 5-MDMT и пинолина не наблюдалось. Специфичность пинолина по отношению к CYP2D6 около 99% относительно других изоферментов цитохрома Р-450.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа отбирали кровь у пациентов обоих полов. Перед экстракцией кровь центрифугировали и для дальнейшего анализа отбирали плазму. Образцы чистой и исследуемой плазмы хранили в морозильнике для плазмы при температуре от –75 °С до –80 °С. Стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре 2–8 °С.

Пробоподготовку проводили методом твердофазной экстракции (ТФЭ) на сериях плазмы с добавлением пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина до достижения концентраций 250, 375, 500, 750, 1000, 1250 и 1500 пг/мл и внутреннего стандарта галантамина с концентрацией 20 нг/мл. Перед внесением пробы в картридж Chromabond® C18 для ТФЭ проводили активацию сорбента. В картридж, подключенный к вакуумному насосу, вносили 2 мл метанола, затем 1 мл воды и 2 мл боратного буфера pH 9,6.

В активированный картридж вносили 500 мкл плазмы, затем последовательно добавляли 1 мл воды, 1 мл смеси ацетонитрил – вода (10:90), элюирование проводили 0,5 мл 0,1% раствором триэтиламина в метаноле. Полученный элюат упаривали до сухого остатка и растворяли в 100 мкл 1% муравьиной кислоты в воде.

В качестве метода определения был выбран метод обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием на МС-детекторе с системой трех квадруполей.

Исследуемые вещества – пинолин (рисунок 1) и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин (рисунок 2) – и внутренний стандарт галантамин (рисунок 3) являются полярными, ароматическими и проявляют основные свойства. Для хроматографирования полученных проб использовали предколонку Agilent Zorbax Eclipce Plus C18 12,5x2,1 мм, 5 мкм и колонку Agilent Zorbax Eclipce Plus C18 RRHD 100x2,1 мм, 1,8 мкм.

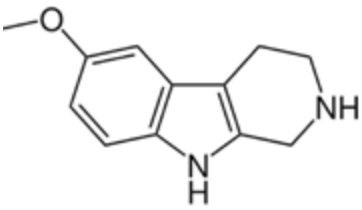


Рисунок 1. **Пинолин**

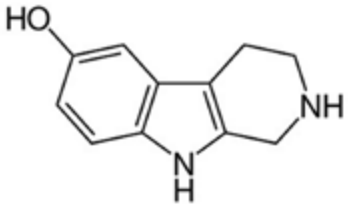


Рисунок 2. **6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин**

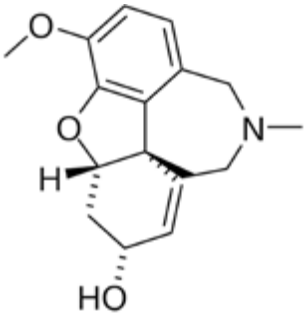


Рисунок 3. **Галантамин**

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были подобраны следующие хроматографические условия:

Предколонка: Agilent Zorbax Eclipce Plus C18 12,5x 2,1 мм, 5 мкм.

Колонка: Agilent Zorbax Eclipce Plus C18 RRHD 100x 2,1 мм, 1,8 мкм.

Температура колонки: (50±1) °С.

Детектирование: МС/МС, MRM-переходы для пинолина 203,2 m/z → 174,0 m/z, для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина 189,2 m/z → 160,0 m/z, для галантамина 288,3 m/z → 213,0 m/z.

Метод ионизации: электроспрей (ESI) в положительной полярности.

Объем пробы: 5 мкл.

Время удерживания:

– 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – 1,1 мин;

– пинолин – 5,0 мин;

– галантамин – 2,4 мин.

Время хроматографирования: 14 мин.

Скорость потока: 0,4 мл/мин.

Подвижная фаза:

Элюент А: 5 мМ аммония формиата и 0,01% муравьиной кислоты в воде.

Элюент В: 0,01% муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Методика

Стабилизируют систему ВЭЖХ в условиях начального градиента (элюент А : элюент В = 95:5) в течение 15 мин.

Градиентная программа

Время, мин	Элюент А, % (об/об)	Элюент В, % (об/об)
0	95	5
1,5	95	5
2	70	30
8,5	40	60
12	95	5
14	95	5

В качестве метода количественного определения был выбран метод калибровки с внутренним стандартом. Для построения калибровочного графика были приготовлены растворы в плазме с добавлением известного количества стандартных образцов пинолина, его метаболита и внутреннего стандарта галантамина. Сначала готовили стандартные растворы пинолина, его метаболита и галантамина в метаноле. Затем путем разведения этих растворов в плазме получали серию калибровочных растворов. Концентрации калибровочных растворов были следующие: 250 пг/мл, 375 пг/мл, 500 пг/мл, 750 пг/мл, 1000 пг/мл, 1250 пг/мл и 1500 пг/мл. Концентрация внутреннего стандарта галантамина составила 20 нг/мл. После хроматографирования полученных растворов строили калибровочные графики зависимости отношения площадей исследуемого вещества к внутреннему стандарту (ось X) от известных концентраций (ось Y), по которым определяли концентрации пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина.

Методика была валидирована на основе «Руководства по экспертизе лекарственных средств» под редакцией проф. А.Н. Миронова., том I, а также руководств FDA [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). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001] и EMA (Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. 2009) по показателям линейности, селективности, правильности, прецизионности и пределу количественного определения.

Диапазон линейности определения был доказан для обоих аналитов в диапазоне концентраций от 250 пг/мл до 1500 пг/мл. Коэффициент корреляции составил R=0,99474 для пинолина и R=0,99534 для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина. Уравнение калибровочной кривой для пинолина: y=0,0026x + 0,0574; для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина: y = 0,0048x + 0,0671.

Селективность. На хроматограммах образцов интактной плазмы, очищенной от пинолина и его метаболита путем жидкостной экстракции, не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим пинолину, метаболиту пинолина и галантамину.

На хроматограмме плазмы, содержащей стандартные образцы пинолина, его метаболита и галантамина, пики не накладывались. Разрешение пиков составляло более 1,5 между каждым пиком.

Правильность и прецизионность. Правильность и прецизионность определяли в течение 1 рабочего дня (внутри серии) и в течение нескольких дней (между сериями) на 4 уровнях концентраций: 250 пг/мл, 375 пг/мл, 750 пг/мл и 1500 пг/мл. Расчёт концентраций определяемых веществ в образцах контроля качества выполняли по уравнению калибровочного графика, полученного в составе текущей аналитической серии. Значения относительного стандартного отклонения и относительной погрешности для значений концентраций для нижней точки не превышала 20%, а для остальных – 15%.

Предел количественного определения. Предел количественного определения для пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина составил 250 пг/мл. Критерием предела количественного определения служило соотношение «сигнал : уровень флуктуационных шумов нулевой линии» не менее 4:1.

Пригодность хроматографической системы. Разрешение пиков пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина было не менее 1,5; это говорит о полном их разделении. Фактор асимметрии пика пинолина – 1,37, а 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина – 1,24. Значение эффективности для испытуемых веществ и внутреннего стандарта составила 25123, что говорит о высокой эффективности хроматографической системы (требуется значение не менее 3000).

Таблица 1.

Правильность и прецизионность методики количественного определения пинолина

Введено (пг/мл)	Относительное стандартное отклонение, % (n=5)		Относительная погрешность, % (n=5)	
	Внутри серии	Между сериями	Внутри серии	Между сериями
250	8,95	9,01	11,24	12,48
375	7,13	7,47	7,65	8,12
750	4,67	4,81	5,12	5,87
1500	1,57	1,14	3,12	3,31

Таблица 2.

Правильность и прецизионность методики количественного определения 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина

Введено, пг/мл	Относительное стандартное отклонение, % (n=5)		Относительная погрешность, % (n=5)	
	Внутри серии	Между сериями	Внутри серии	Между сериями
250	6,84	7,35	9,12	11,64
375	5,78	6,01	8,05	9,18
750	4,12	4,41	5,61	6,12
1500	2,85	2,90	4,12	4,48

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана чувствительная методика количественного определения пинолина и его метаболита в плазме после пробоподготовки ТФЭ с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с

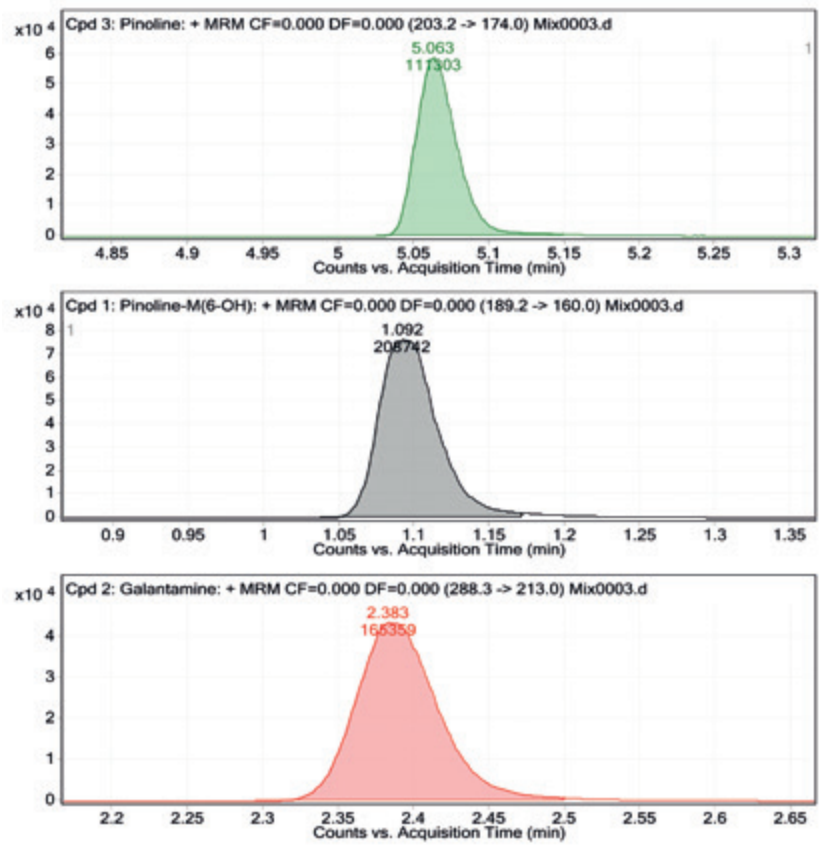


Рисунок 4. Хроматограмма раствора, содержащего пинолин (250 пг/мл), его метаболит (250 пг/мл) и раствор внутреннего стандарта (20 нг/мл)

трехквадрупольным масс-спектральным детектированием. Данный метод был валидирован по показателям линейности, селективности, правильности, прецизионности и пределу количественного определения. Аналитический диапазон методики составил 250–1500 пг/мл. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

С помощью разработанной методики было проведено исследование по оценке активности изофермента CYP2D6, результаты которого приведены в статье [6]. По результатам измерений был сделан вывод о возможности дальнейшего использования методики для определения текущего статуса активности CYP2D6. Так как данная методика является неинвазивной, ее можно использовать у пациентов с непереносимостью экзогенных маркерных субстратов, а также у беременных, кормящих женщин и детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. H.P. Sheldon, et al. Cytochrome P450 2D6 Phenoconversion Is Common in Patients Being Treated for Depression: Implications for Personalized Medicine // Journal of Clinical Psychiatry. 2013. V.74(6). P. 614–621.
2. В.Г. Кукес, Д.А. Сычев, Е.В Ших. Изучение биотрансформации лекарственных средств – путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии // Врач. 2007. № 1. С. 6–8.
3. В.Г. Кукес. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. – М.: Издательство «Реафарм», 2004. 144 с.
4. U.M. Zanger, S. Raimundo, M.Eichelbaum. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry // Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology. 2004. V. 369. P. 23–37.
5. A. Yu, et al. Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase // Pharmacogenetics. 2003. V. 13. P. 307–319.
6. Д.А. Сычев, М.С. Застрожин, В.В. Смирнов, Л.М. Савченко, Е.А. Брюн, Ю.Ш. Гущина, А.С. Сорокин, А.Д. Агузаров. Ассоциация активности изофермента CYP2D6 с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих патологическим влечением к алкоголю // Вестник РГМУ. 2015. № 4 С. 32–36.

Fleming.

2-ая Ежегодная

КОНФЕРЕНЦИЯ

Обеспечение качества в фармацевтическом производстве

Россия и страны ЕАЭС

1-3 июня 2016 | Москва, Россия



www.fleming.events

Свяжитесь с нами: Тел +421 257 272 145 andrea.weber@fleming.events

УДК 615.1, 615.21, 615.3

СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИЕ НЕНАРКОТИЧЕСКИЕ АНАЛЬГЕТИКИ КАК НАПРАВЛЕНИЕ РАЗВИТИЯ ФАРМАЦЕВТИКИ

А.В. Соснов[1,2]*, С.В. Садовников[1], Ф.М. Семченко[2], К.А. Руфанов[2], В.Н. Тохмахчи[2], А.А. Соснова[2], И.А. Тюрин[3]

1 – ОАО ФНТЦ «Инверсия», 107031, Россия, г. Москва, ул. Рождественка, 27

2 – ФГУП «Государственный завод медицинских препаратов» (ФГУП «ГосЗМП»), 111024, Россия, г. Москва, шоссе Энтузиастов, 23

3 – ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского», 129010, Россия, г. Москва, Большая Сухаревская площадь, 3

1 – Federal S&T Center «Inversiya», 27, Rozdestvenskaya str., Moscow, 107031, Russia

2 – The Federal State Unitary Enterprise State Pharmaceutical Plant (FSUE «GosZMP»), 23, Enthusiasts highway, Moscow, 111024, Russia

3 – N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, 3, Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow, 129010, Russia

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

Резюме. В статье описаны подходы к выбору наиболее актуальных сильнодействующих ненаркотических анальгетиков среди веществ, находящихся на различных стадиях исследований и разработок. Препараты ненаркотических анальгетиков для купирования сильной и средней боли являются относительно новым направлением фармацевтики. Их внедрение в качестве альтернативы опиатам весьма актуально. Однако число реальных кандидатов крайне ограничено. В результате проведенного авторами анализа один из наиболее сильнодействующих ненаркотических анальгетиков – блокатор натриевых каналов нейронов ПНС тетродотоксин (ТТХ) был признан наиболее актуальным. В настоящее время ФГУП «ГосЗМП» проводит доклинические исследования инъекционного препарата на основе ТТХ.

Ключевые слова: болевой синдром, сильнодействующий ненаркотический анальгетик, соединения-лидеры, биомишени нервной системы, блокатор ионных каналов, тетродотоксин.

POTENT NON-NARCOTIC ANALGESICS AS A DIRECTION IN DEVELOPMENT OF PHARMACEUTICALS

A.V. Sosnov[1,2]*, S.V. Sadovnikov[1], F.M. Semchenko[2], K.A. Rufanov[2], V.N. Tohmahchi[2], A.A. Sosnova[2], I.A. Tyurin[3]

Abstract. The article describes some approaches to choice of the most potent non-narcotic analgesics among agents investigated in various R&D stages. Preparations non-narcotic analgesics for relief of severe and moderate pain are relatively new area of pharmaceuticals. Their application is very important as an alternative to opiates. However, the actual number of drug candidates is very limited. As a result of the authors analysis one of the most potent non-narcotic analgesics (PNS neurons sodium channel blocker) – Tetrodotoxin (TTX) was recognized as the most promising. Currently FSUE «GosZMP» conducting preclinical studies of injectable preparation of TTX.

Keywords: severe and moderate pain, potent non-narcotic analgesic, lead compounds, biotargets of nervous system, ion channel blocker, tetrodotoxin.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной задачей промышленности РФ является импортозамещение наиболее востребованной населением и государственными структурами промышленной продукции. При этом важно наладить выпуск именно высокотехнологичной продукции, отвечающей современному уровню, а также (для экономии времени и ресурсов) использовать имеющийся производственный потенциал. Применительно к фармацевтической промышленности, и в частности к проблеме выбора и внедрения анальгетиков, задача импортозамещения может быть частично решена путем выпуска фармпрепаратов на основе сильнодействующих ненаркотических субстанций. Препараты на основе сильнодействующих ненаркотических анальгетиков наиболее актуальны для лечения потенциально трудоспособных пациентов.

В качестве уже имеющегося производственного потенциала для получения субстанций сильнодействующих анальгетиков (как наркотических, так и ненаркотических) в том числе рассматривается и перепрофилирование бывших объектов по уничтожению химического оружия, имеющих необходимую инфраструктуру и персонал для производства контролируемых веществ первого класса опасности.

ПРИМЕНЕНИЕ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ НЕНАРКОТИЧЕСКИХ АНАЛЬГЕТИКОВ

Существенную роль в снижении трудоспособности лиц старшего возраста играют заболевания, сопровождающиеся выраженным болевым синдромом [1]. По данным Министерства обороны США, примерно половина военнослужащих, выводимых из зон вооруженных конфликтов, требует кратковременной медикаментозной поддержки в связи с болевым синдромом. Около 10% ветеранов испытывают хронический болевой синдром, требующий использования фармпрепаратов в течение длительного времени, часто в течение всей жизни [2]. Специалисты США отмечают, что использование для данных задач препара-

тов на основе сильных наркотических анальгетиков не всегда оправданно, но имеющийся выбор ненаркотических анальгетиков по ряду причин не позволяет решить проблему анальгезии. Тем не менее в экономически развитых странах декларируется тенденция к минимизации использования и усилению контроля за использованием наркотических анальгетиков в случае перспективных для реабилитации пациентов [3].

Номенклатура используемых в РФ анальгетиков (по показаниям, биологическим механизмам действия, количеству разрешенных для анальгезии веществ и т.д.) в несколько раз меньше по сравнению с США и странами ЕС. Потребность пациентов РФ в разрешенных для использования сильнодействующих анальгетиках обеспечивается менее чем на 20% [4, 5], что резко снижает возможность оказания необходимой помощи пациентам в целом, а также делает невозможным подбор рациональной схемы терапии для конкретного пациента. Текущая ситуация исключает развитие персонализированной анальгезии для хронических пациентов в РФ.

Решение начальных задач импортозамещения направлено на устранение дефицита наиболее необходимых традиционных препаратов изделиями отечественного производства, что является скорее экономической и организационной, чем научно-технической задачей. Тогда как развитые страны акцентируют усилия на исследованиях и разработках в области персонализированной медицины, в том числе и в рамках стратегии продления трудовой и экономической активности все более стареющего населения [6] с высоким процентом заболеваний, сопровождающихся болевым синдромом.

Одним из путей инновационного развития фармацевтики в РФ является разработка и интенсивное внедрение в практику улучшенных препаратов на основе веществ, уже разработанных и внедренных фармацевтической индустрией в клиническую практику развитых стран или находящихся на 2–3 стадиях клинических исследований. Разработка новых соединений-кандидатов в лекарства, а также новых пролекарств и супрамолекулярных соединений на основе известных фармакологически актуальных веществ также крайне актуальна, но требует существенно больших финансовых затрат и более продолжительна.

В процессе выбора наиболее актуальных соединений для разработки и производства в РФ препаратов-анальгетиков наибольший практический интерес представляют сильнодействующие ненаркотические анальгетики, действующие на центральную и периферическую системы передачи нервного импульса у человека (ЦНС и ПНС соответственно). Данные вещества обладают рядом преимуществ:

– не входят в списки особо контролируемых лекарств, что не создает немедицинские проблемы для врачей и пациентов в РФ;

– низкие терапевтические дозы не ограничивают разнообразие возможных лекарственных форм;

– минимальные побочные эффекты не оказывают принципиального воздействия на работоспособность, т.е. наиболее пригодны для экономически активной и трудоспособной части населения;

– как правило, не вызывают эйфории;

– не вызывают физиологической и, как правило, психологической зависимости.

Все перечисленные выше преимущества в наибольшей степени относятся к сильнодействующим ненаркотическим анальгетикам, действующим на ПНС, что проиллюстрировано ниже на примере исследования тетродотоксина в качестве анальгетика.

Для выбора веществ-кандидатов в целях разработки новых для РФ препаратов-анальгетиков проведен анализ баз данных и первичных источников информации. Выбор актуальных соединений включает использование на начальном этапе интерактивной сетевой базы данных по медицинской и фармацевтической химии Thomson Reuters Integrity (TRI) [7]. В процессе выбора учтены ключевые научно-технические, технологические, экономические и юридические критерии, в том числе тип биомишени, локализация биомишени (ЦНС и/или ПНС), терапевтическая доза, быстродействие, продолжительность действия, разнообразие возможных лекформ, дополнительные полезные свойства, побочные эффекты, доступность субстанции и др.

В результате один из наиболее сильнодействующих ненаркотических анальгетиков – блокатор натриевых каналов нейронов ПНС тетродотоксин (ТТХ) был признан наиболее актуальным [8]. В настоящее время ФГУП «ГосЗМП» проводит доклинические исследования инъекционного препарата на основе ТТХ.

АНАЛИЗ ДАННЫХ И ПЕРВИЧНЫЙ ОТБОР ВЕЩЕСТВ-КАНДИДАТОВ

В настоящее время в развитых странах для терапии выраженной ноцицептивной боли у населения в стационарных и амбулаторных условиях используются в основном два типа анальгетиков: на основе опиатов с различной анальгетической активностью и на основе нестероидных противовоспалительных веществ (НПВС/NSAID), а также различные их комбинации в схемах мультимодальной терапии [9]. Для купирования острой и сильной боли при экстренной помощи населению, а также обезболивания военнослужащих стран НАТО в полевых условиях используются главным образом опиаты и кетамин (NMDA-антагонист) [10, 11]. Для менее интенсивной боли могут использоваться комбинации с добавлением агонистов альфа-2-адренорецепторов (клонидин или дексмедетомидин) или NSAIDs [10, 11].

Основным недостатком NSAID является слабый анальгетический эффект в случае сильной и средней боли. Лимитирующими недостатками опиатов являются выраженные дозозависимые побочные эффекты и высокая вероятность развития физиологической и психической зависимости, приводящие к инвалидизации трудоспособного населения. Аналогичные побочные эффекты в меньшей степени характерны и для анальгетиков из класса каннабиоидов. Кетамин/(S)-кетамин обладает выраженными свойствами анестетика и имеет ограничения для анальгезии, поскольку вероятно развитие психической зависимости.

Расширение использования наркотических анальгетиков для трудоспособного населения находится в противоречии со стратегической политикой Евросоюза в области фармацевтики, акцентированной на продлении трудоспособности и экономической активности стареющего населения [6]. Попытка ограничения использования наркотических анальгетиков для купирования хронической боли у потенциально трудоспособных пациентов проводится в США, например, в отношении ветеранов боевых действий [3]. Однако реально в США наблюдается тенденция к увеличению медицинского потребления наркотических анальгетиков [12–15], что может быть объяснено рядом факторов [12], включая отсутствие в клинической практике мощных ненаркотических анальгетиков.

Использование сильнодействующих ненаркотических анальгетиков вместо наркотических позволит продлить период трудоспособности населения. Причем некоторые типы ненаркотических анальгетиков, например блокаторы натриевых каналов, включая TTX [16, 17], демонстрируют способность купировать зависимость от наркотических и других психоактивных веществ, клинически исследуются с целью лечения алкогольной зависимости.

Мировая фармацевтическая индустрия (производящая в настоящее время, по данным TRI, около 100 различных веществ и их комбинаций в качестве анальгетиков) последовательно развивает направления, основанные на нескольких десятках механизмов биологического действия анальгетиков. Приведенный ниже статистический анализ текущей ситуации выполнен и частично визуализирован средствами интерактивной сетевой базы данных по фармацевтике и медицинской химии Thomson Reuters Integrity (TRI) [7].

На рисунке 1 представлены статистические данные по основным биологическим мишеням для анальгезии и соответствующим им количествам веществ, прошедшим как минимум частичные доклинические исследования. Следует отметить, что не для всех веществ выявлен ключевой молекулярный биологический механизм, ответственный за анальгетический эффект, поэтому далее при обсуждении будут рассматриваться только вещества с доказанным механизмом биологического действия. Т.е. вещества, для которых установлена количественная корреляция между экспериментальными данными в тестах *in vitro* на изолированных биомишенях и анальгетической активностью *in vivo*.

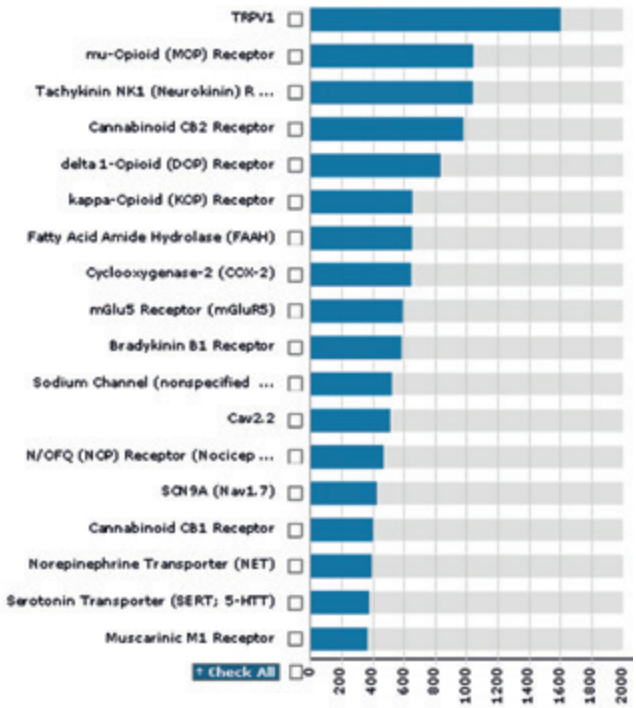


Рисунок 1. Основные биомишени исследованных веществ с анальгетической активностью

Данные рисунка 1 отражают уровень интереса разработчиков (а также, косвенно, сравнительный общий уровень затрат на НИОКР) к веществам-анальгетикам с различными молекулярными механизмами действия. На рисунке 2 представлены данные по основным молекулярным механизмам действия соединений-лидеров (прошедших как минимум доклинические исследования) среди анальгетиков, для которых доказан механизм действия. Это в несколько раз сужает выборку актуальной для анализа информации. Анализ текущей ситуации средствами TRI в области анальгетиков показывает:

– в клинических фазах исследований (КИ) находятся около 230 различных препаратов;

– в доклинических фазах исследований (ДКИ) находятся около 2360 препаратов-анальгетиков на основе индивидуальных веществ и комбинаций фиксированного состава;

– в стадиях биологического тестирования (БТ) находятся около 21 тыс. химических и биологических соединений, проявляющих анальгетическую активность;

– всего имеется около 6600 соединений-лидеров (Lead Compounds), из них наиболее активно исследуются 102 вещества.

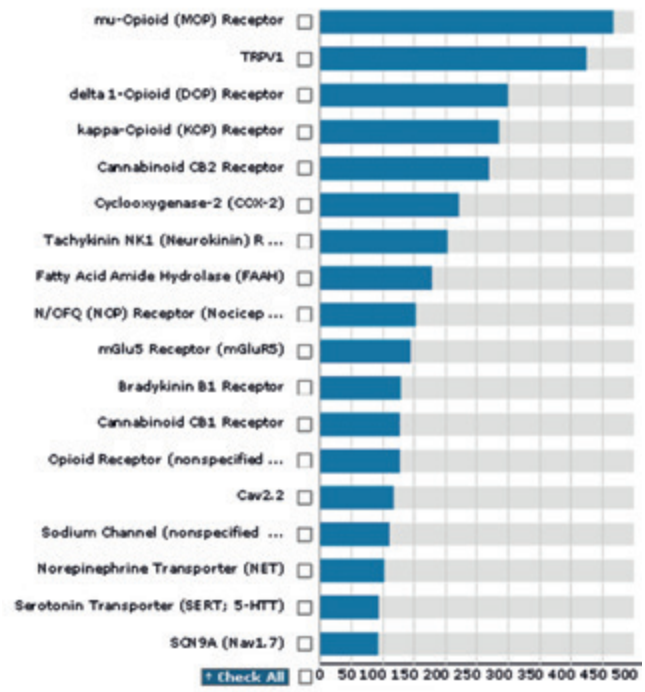


Рисунок 2. **Основные биомишени известных соединений-лидеров**

Данные выборки были использованы при выборе кандидатов для внедрения в практику наиболее актуальных для медицины РФ анальгетиков для купирования сильной и средней боли. С одной стороны, при выборе кандидатов в лекарства (с точки зрения терапии средней и сильной боли) наиболее актуальны вещества – модуляторы передачи и генерации нервных импульсов. Именно вещества, действующие на центральную (ЦНС) и периферическую (ПНС) нервную систему человека, обладают наивысшей анальгетической активностью и, соответственно, действуют на организм человека в минимально возможных дозах. Низкие терапевтические дозы позволяют использовать данные вещества в самых различных лекарственных формах, а также создавать на их основе самые разнообразные пролекарства и нековалентные супрамолекулярные коньюгаты. С другой стороны, имеется обоснованная потребность перехода на ненаркотические анальгетики, не влияющие на сознание, слабо влияющие на работоспособность, не вызывающие привыкание и зависимость, что весьма актуально для использования трудоспособными пациентами. Данным требованиям отвечают ненаркотические анальгетики центрального и периферического действия. На рисунке 3 представлена статистика распределения фармацевтических исследований по молекулярным механизмам действия (в порядке убывания количества исследованных веществ и композиций) ненаркотических анальгетиков.

Из данных рисунка 3 следует, что к фармакологически наиболее актуальным биомишеням нервной системы человека (ЦНС и ПНС) относятся: блокаторы (антагонисты) ионных натриевых каналов; агонисты ванилоидных рецепторов, блокаторы ионных кальциевых каналов; активаторы (агонисты) ионных калиевых каналов; агонисты n- и m- холинорецепторов (nAChR и mAChR соответственно); агонисты альфа-2-андренорецепторов; NMDA-антагонисты; антагонисты mGluR5-рецепторов и др. Агонисты каннабиноидных рецепторов не относятся к опиатам, но могут демонстрировать специфические центральные эффекты. Некоторые вещества одновременно действуют на

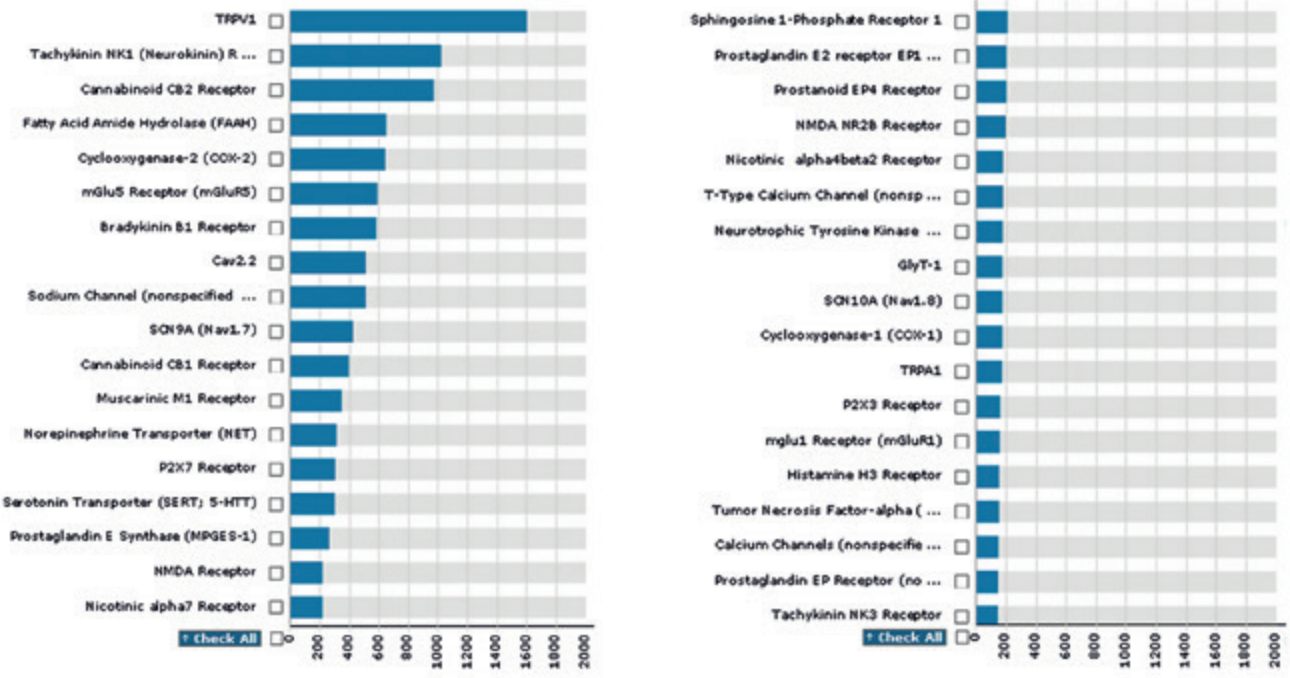


Рисунок 3. **Распределение подробно исследованных веществ по типам биомишеней среди ненаркотических анальгетиков**

несколько биомишеней, связанных с анальгетическим эффектом, а также на другие фармакологически актуальные мишени. Такие вещества рассматриваются в концепции создания мультитаргетных лекарств (MTDD) в рамках более общего и относительно нового направления – полифармакологии.

В качестве примера на основе анализа данных TRI приведена статистика по соединениям (действующим на ЦНС и/или ПНС) для 6 наиболее актуальных молекулярных механизмов терапевтического действия ненаркотических анальгетиков.

1. **Блокаторы фармакологически актуальных натриевых каналов (VGSC) ЦНС и ПНС:**

a. 8 веществ и несколько их комбинаций с другими анальгетиками уже используются: бупивакаин, амитриптилин, фенитоин, ропивакаин, карбамазепин, эсликарбазепина ацетат, кверцетин и руфинамид (имеют широкий спектр терапевтического использования);

b. 2 вещества и несколько комбинаций находятся в 3-й фазе клинических исследований; тетродотоксин (TTX), приралфинамид;

c. 11 веществ находятся во 2-й фазе клинических исследований: RSD-921, BW-4030W92, LTA, карисбамат, кробенетин, CNV-1014802, PF-05089771, фунапид, элпетригин и резвератрол демонстрируют широкий спектр возможного терапевтического использования, соединение GIC-1001 одновременно проявляет свойства блокатора терапевтически значимых натриевых каналов и агониста опиатных рецепторов;

d. 16 веществ находятся в 1-й фазе клинических исследований: неосакситоксин, GTX 2 и 3, E-2070, NKTR-171, AZD-3161, DSP-2230, PF-05241328, GDC-0276, HTX-011 (является блокатором натриевых каналов и NSAID);

e. 197 веществ находятся на стадиях доклинических исследований.

2. **Агонисты ванилоидных рецепторов (TRPV1, «рецепторы капсаицина», входящие в состав катионных каналов ПНС):**

a. 4 вещества уже используются: капсаицин (транскапсаицин), (Z)-капсаицин, этодолак и пропофол (анестетик с анальгетической активностью);

b. 2 комбинации на основе веществ п. 2a находятся в 3-й фазе клинических исследований;

c. 11 веществ находятся во 2-й фазе клинических исследований: капсаванил, (+)-резинифератоксин, DE-096, N-(2-бромфенил)-N'-[1-[5-(трифторметил) пиридин-2-ил] пирролидин-3(R)-ил] мочевина (в качестве анальгетика и антимигренозного средства), NGD-8243, GRC-6211, DWP-05195, XEN-D0501, SYL-1001, PAC-14028, V-116517;

d. 14 веществ находятся в 1-й фазе клинических исследований: нуванил, пиперин, AMG-517, ABT-102, AZ-11760788, AZ-12048189, AZ-12099548, SAR-115740, маватреп, DD-04107, каннабидиварин, TR-1, NEO-6860;

e. 159 веществ находятся на стадиях доклинических исследований.

3. **Блокаторы различных кальциевых каналов (N-, T-, L-подтипы, ЦНС и ПНС):**

a. 7 веществ используются как анальгетики: зиконотид, флюнаризин, зонисамид, ломеризин, прегабалин, (S)-(-)-тетрагидропалматин, леветирацетам;

b. 2 вещества находятся в 3-й фазе клинических исследований: дотаризин, мирогабалин;

c. 4 вещества находятся во 2-й фазе клинических исследований: PD-217014, CNV-2197944/ GSK-2197944, RNS-60 и сипатригин (основное использование – терапия инсульта);

d. 4 вещества находятся в 1-й фазе клинических исследований: леконотид, PF-293765, нортриптилин-ГАМК, Z-944;

e. 92 вещества находятся на стадиях доклинических исследований.

4. **Активаторы ионных калиевых каналов ЦНС и ПНС:**

a. 1 вещество используется как анальгетик: флупертин, проявляющий также свойства NMDA-антагониста;

b. в 3-й фазе клинических исследований веществ нет;

c. 1 вещество находится во 2-й фазе клинических исследований: ICA-105665;

d. в 1-й фазе клинических исследований веществ нет;

e. 3 вещества находятся на стадиях доклинических исследований.

5. **Эффекторы никотиновых (nAChR) рецепторов ЦНС**

a. 2 вещества используются как анальгетики: кобротоксин и (S)-(-)-тетрагидропальматин;

b. в 3-й фазе клинических исследований веществ нет;

c. 2 вещества находятся во 2-й фазе клинических исследований: софиниклин / софиниклина бесилат и TC-6499;

d. 3 вещества находятся в 1-й фазе клинических исследований: радафксин, A-366833 и комбинация Келоки;

e. 65 веществ находятся на стадиях доклинических исследований.

Следует отметить, что данная группа содержит высокий процент анальгетиков – агонистов и антагонистов никотиновых рецепторов, отклоненных по результатам клинических исследований, в отношении которых существовали ожидания принципиального прорыва в области ненаркотических анальгетиков, действующих на ЦНС, например: ABT-594 и A-98593 (S-изомер), ABT-202, альфа-конотоксин, TC-2696.

6. **Агонисты каннабиноидных рецепторов (Cannabinoid CB2 и CB1, преимущественно локализованых в ЦНС):**

a. 4 вещества уже используются: дронабинол, набихимолс, а также пальмидрол и цезамет/набилон преимущественно не в целях анальгезии;

b. 1 вещество находится в 3-й фазе клинических исследований: каннабидиол;

c. 3 вещества находятся во 2-й фазе клинических исследований: 842166X, LY-2828360, KN-38-7271;

d. 9 веществ находятся в 1-й фазе клинических исследований: SAD-448, Org-26828, 2-[N-[2-[7-хлор-1-(тетрагидропиран-4-илметил)-1H-индол-3-ил] тиазол-4-илметил]-N-изопропиламино]этанол, каннабидиварин, LBP-1, MP-10X, GRC-10693, APD-371, NEO-1940;

e. 183 вещества находятся на стадиях доклинических исследований.

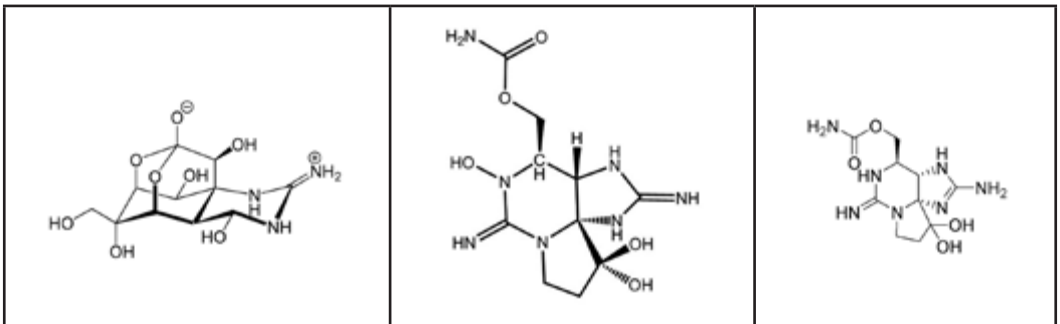
ТЕТРОДОТОКСИН КАК РЕЗУЛЬТАТ ОТБОРА ВЕЩЕСТВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ НЕНАРКОТИЧЕСКИХ АНАЛЬГЕТИКОВ

Наиболее остро в РФ стоит проблема выпуска отечественных сильнодействующих ненаркотических анальгетиков, что и явилось основным критерием выбора вещества для разработки инъекционного препарата. В результате проведенного анализа данных для создания препарата было выбрано одно из наиболее активных низкомолекулярных веществ природного происхождения – тетродотоксин (ТТХ) – сильнодействующий блокатор натриевых каналов нейронов ПНС, содержащий гуанидиновый структурный фрагмент (рисунок 4А).

ТТХ является токсином, характерным для рыб семейства иглобрюхих, обнаружен у некоторых видов тритонов, осьминогов, лягушек и др. Тетродотоксин и его аналоги могут синтезировать некоторые бактерии; предполагается, что животные получают его от бактерий-симбионтов, обитающих в их кишечниках. ТТХ для различных целей промышленно выделяется из рыбы фугу.

Выбор ТТХ для купирования острой сильной и средней боли обусловлен мощным анальгетическим действием на фоне крайне незначительных побочных эффектов в терапевтических дозах, что подтверждено данными 2-й и 3-й фазы клинических исследований [8, 18, 19]. В случае лечения хронического болевого синдрома у онкологических пациентов выбор ТТХ подкрепляется его способностью подавлять метастазирование раковых клеток, а также купировать зависимость от психоактивных веществ. Это принципиально отличает ТТХ от анальгетиков-опиатов, активирующих рост сосудистой ткани опухоли, демонстрирующих мощное побочное действие на ЦНС и вызывающих физическую и психологическую зависимости [20].

Среди веществ данного типа в несколько раз меньшую терапевтическую активность демонстрирует неосакситоксин (NeoSTX, NSTX, рисунок 4Б), представляющий меньший интерес для терапевтического использования. Наиболее известный природный токсин данного типа – сакситоксин (STX, рисунок 4В). Свое название сакситоксин получил от съедобных моллюсков рода *Saxidomus*, накапливающих сакситоксин и его производные при питании динофлагеллятами и цианобактериями в периоды их бурного размножения («красные приливы»), что делает морские организмы непригодными для коммерческого использования. В настоящее время STX не рассматривается в качестве

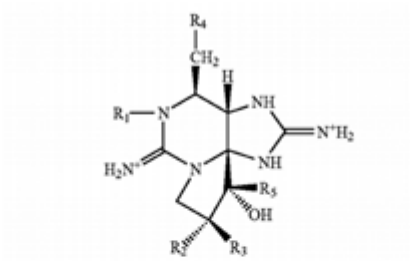


4А. Тетродотоксин (ТТХ)	4Б. Неосакситоксин (NeoSTX, NSTX)	4В. Сакситоксин (STX)

Рисунок 4. Наиболее известные агонисты VGSC из исследованных в качестве потенциальных анальгетиков

потенциального анальгетика, однако ^{18}F-производное сакситоксина проходит клинические исследования в качестве диагностического средства [21, 22].

Среди аналогов STX также исследованы гониаутоксины (gonyautoxins, GTX 1-5), изомеры decarbamyloxySTX (dcSTX), deoxydecarbamoylSTX (doSTX), FDSTX, FDdcSTX, FDdoSTX и др. [23, 24]. Интересной фармакологической особенностью аналогов STX, в первую очередь гониаутоксинов GTX-2 и GTX-3 (рисунок 5), является возможность их использования в трансдермальных лекарственных формах [25].



Compound	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Gonyautoxin 1	—OH	—H	$—OSO_3^-$	$—COONH_2$	—OH
Gonyautoxin 2	—H	—H	$—OSO_3^-$	$—COONH_2$	—OH
Gonyautoxin 3	—H	$—OSO_3^-$	—H	$—COONH_2$	—OH
Gonyautoxin 4	—OH	$—OSO_3^-$	—H	$—COONH_2$	—OH
Gonyautoxin 5	—H	—H	—H	$—COONHSO_3^-$	—OH
Saxitoxin	—H	—H	—H	$—COONH_2$	—OH
Neosaxitoxin	—OH	—H	—H	$—COONH_2$	—OH
Descarbamoylsaxitoxin	—OH	—H	—H	—OH	—OH

Рисунок 5. Структурные аналоги STX: гониаутоксины (1-5) и дескарбамоилсакситоксин – агонисты VGSC, исследованные в составе трансдермальных композиций [25]

По данным клинических исследований, доза TTX для пациента составляет 10–30 мкг/сутки [8, 18, 19], не вызывает развития привыкания и зависимости. Сравнение с другими типами сильнодействующих анальгетиков показывает, что эквипотенциальные дозы TTX:

– более чем в 3 тысячи раз ниже доз бупивакоина (терапевтическая доза 25–150 мг и выше), его хиральной формы – левобупивакоина и его хирального аналога – ропивакаина, наиболее сильных из широко используемых в клинической практике анальгетиков – эффекторов ионных каналов [26, 27];

– в 2–3 тысячи раз ниже доз наиболее распространенного сильнодействующего наркотического анальгетика морфина;

– почти на порядок ниже доз фентанила и бупренорфина, традиционно наиболее востребованных из числа наиболее мощных наркотических анальгетиков для терапии сильной боли;

– в 3–5 раз ниже по сравнению с дозами наиболее близкого экспериментального аналога – NeoSTX, находящегося в первой фазе клинических исследований [28, 29] и представляющего существенно меньший интерес для фармацевтики.

Данные таблицы 1 показывают, что TTX блокирует 6 изоформ натриевых ионных каналов в наномолярных концентрациях, два из которых (локализованые в ПНС) отвечают за блокирование болевого сигнала тетродотоксином [30–32].

Таблица 1.

Терапевтически актуальные биомишени и эффективные концентрации TTX

Подтип ионного канала (биомишень)	TTX-чувствительность (EC_{50})	Локализация биомишени (локализация нейронов в ПНС/ЦНС)
$Na_V1.9$	40 мкмоль	анальгетически актуальная биомишень ПНС
$Na_V1.8$	60 мкмоль	анальгетически актуальная биомишень ПНС
$Na_V1.7$	24,5 нмоль	TTX-анальгетически актуальная биомишень ПНС
$Na_V1.6$	6 нмоль	TTX-анальгетически актуальная биомишень (ПНС/ЦНС)
$Na_V1.5$	5,7 мкмоль	биомишень в сердечной мышце, ассоциированная с острой токсичностью TTX
$Na_V1.4$	25 нмоль	скелетная мускулатура
$Na_V1.3$	4 нмоль	ЦНС
$Na_V1.2$	18 нмоль	ЦНС
$Na_V1.1$	6 нмоль	ЦНС

Прогноз терапевтического индекса (ТИ) блокаторов ионных каналов данного типа, по данным тестов *in vitro*, пропорционален величине соотношения $EC_{50}(Na_V1.5)/EC_{50}(Na_V1.x)$, где X=7 и, возможно, X=6 (для биомишени, локализованной в ПНС) [33–36]. Сочетание высокой аффинности и высокой специфичности TTX к терапевтически значимым мишеням ПНС с неспособностью TTX преодолевать гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) уникально. Поэтому TTX демонстрирует сочетание крайне низких терапевтических доз с приемлемым терапевтическим индексом (около 100) при отсутствии воздействия на ЦНС, а также отсутствие развития толерантности и различных зависимостей [37]. Место препаратов на основе TTX среди анальгетиков (по оценке WEX Pharmaceuticals Inc.) представлено на рисунке 6. Необходимо отметить, что использование комбинаций фиксированного состава на основе TTX способно еще более расширить

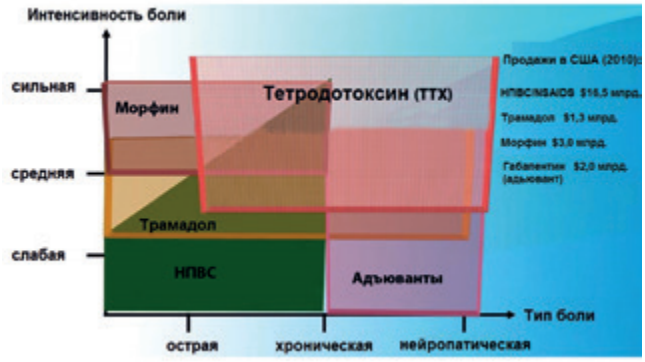


Рисунок 6. Место тетродотоксина (ТТХ) среди препаратов-анальгетиков (Tetrodotoxin: a new class of non-opioid analgesic, WEX Pharmaceuticals Inc., 2013) [54]

представленную на рисунке 6 область использования данного типа ненаркотических анальгетиков.

Актуальность выбора ТТХ в качестве анальгетика для онкологических пациентов также обусловлена его потенциальной способностью подавлять метастазирование некоторых видов опухолей, поскольку натриевые каналы играют важную роль в регуляции клеточной миграции, инвазии и пролиферации. В обзоре [38] показано, что VGSC активированы в различных типах метастатических раковых клеток. Отмечено, что VGSC представляют интерес в качестве диагностической и терапевтической мишени для онкологии. В таблице 2 суммированы результаты исследований активации VGSCs в опухолевых тканях.

Одними из наиболее актуальных для исследования действия ТТХ являются опухоли, состоящие из клеток рака предстательной железы (РПЖ) PC-3 и LNCaP, в которых резко активирована экспрессия мРНК подтипов каналов $Na_v1.6$ и $Na_v1.7$. Предполагается, что эти подтипы могут быть потенциальными диагностическими маркерами, а также мишенями для подавления метастазирования некоторых видов РПЖ [52].

Еще одним полезным свойством ТТХ является способность купировать опиатную зависимость в дозах ниже анальгетических (5–10 мкг) [12, 13, 53], что расширяет возможности использования препаратов на основе ТТХ в различных схемах комплексной терапии. Исследование ТТХ целесообразно проводить в рамках концепции разработки мультитаргетных лекарств.

Развиваются несколько направлений разработки препаратов на основе ТТХ как на основе индивидуального вещества, так и на основе комбинаций фиксированного состава, дополнительно включающих известные лекарства, в основном агонисты VGSCs. Данные препараты тестируются с целью использования при купировании онкологической боли (3-я фаза клинических исследований), нейропатической боли (2-я фаза клинических исследований), постоперационной боли (2-я фаза клинических исследований), а также синдрома отмены опиатов (2-я фаза клинических исследований) [54]. Все проведенные клинические и доклинические исследования демонстрируют, что препараты на основе ТТХ не проявляют наркотических свойств и не вызывают привыкания [55].

Children's Medical Center Corp. (CMC) (Бостон, шт. Массачусетс, США) совместно с Massachusetts Institute of Technology (MIT) (Кембридж, шт. Массачусетс, США) разрабатывают различные формы препаратов как на основе индивидуального ТТХ, так и его комбинаций. Изучена эффективная комбинация ТТХ (Tectin) – бупивакаин – адреналин [56]. На доклинических стадиях исследований находятся несколько близких аналогов и производных ТТХ, например 11-Gal-ТТХ [57].

Таблица 2.

Увеличение метастатической активности злокачественных клеток различных опухолей, коррелируемое с экспрессией подтипов VGSCs [38]

Подтип ионного канала	ТТХ-чувствительность, +/– [24]	Тип опухолевых клеток	Ссылки
$Na_v1.9$	–	Лимфома, мелкоклеточный рак легкого	39, 40
$Na_v1.8$	–	–	
$Na_v1.7$	+	Рак груди, рак шейки матки, лимфомы, мезотелиомы, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы	40–46
$Na_v1.6$	+	Рак груди, рак толстой кишки, лимфома, нейробластома, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, мелкоклеточный рак легких, рак предстательной железы	39–44, 46–48, 52
$Na_v1.5$	–	Рак груди, рак толстой кишки, лимфома, нейробластома, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, мелкоклеточный рак легких	39–41, 44, 45, 49, 50
$Na_v1.4$	+	Рак шейки матки, рак яичников, рак предстательной железы	42, 45, 51
$Na_v1.3$	+	Рак яичников, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого	39, 45, 46
$Na_v1.2$	+	Рак шейки матки, злокачественные мезотелиомы, рак яичников, рак предстательной железы	42, 43, 45, 46
$Na_v1.1$	+	Рак яичников	45

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По сочетанию ключевых для анальгетика факторов ТТХ является уникальным веществом с высоким терапевтическим и инновационным потенциалом. Данное вещество не было внедрено в качестве лекарственного средства ранее вследствие недостаточного объема фармакологических данных, недостаточного развития фармтехнологий и методов анализа вещества в биологических средах, позволяющих создавать лекарственные средства на основе веществ с такой высокой активностью. Сдерживающим психологическим фактором также была высокая токсичность ТТХ. При этом ТТХ обладает высоким терапевтическим индексом, побочные эффекты в терапевтическом интервале доз минимальны, кумулятивный эффект и развитие зависимости не наблюдается. Обнаруженная недавно способность ТТХ в дозах ниже анальгетических подавлять метастазирование некоторых типов злокачественных опухолей является дополнительным аргументом в пользу его использования в онкологии.

Данные свойства тетродотоксина позволяют разработать на его основе уникальные препараты, предназначенные для терапии сильной и средней боли различной природы. Данные препараты в первую очередь актуальны для использования трудоспособными пациентами. Высокое быстродействие позволяет использовать препараты на основе ТТХ в качестве мощного анальгетика для купирования болевого синдрома в условиях чрезвычайных ситуаций.

ТТХ – токсин изначально бактериального происхождения [37, 58] – посредством пищевых цепей и жизнедеятельности паразитирующих организмов накапливается в организмах некоторых морских существ. Очищенный ТТХ является побочным продуктом промысла рыб семейства иглобрюхих. Вылов одного вида рыбы из данного семейства – рыбы фугу – составляет более 10 тыс. тонн в год только в Японии. Выход чистого ТТХ (при выделении из отходов) составляет около 1 г с 1 т рыбы фугу. Что обеспечивает избыточное количество исходного ТТХ для фармацевтического использования в мировом масштабе.

Вышесказанное позволяет рассматривать ТТХ как наиболее перспективный новый анальгетик для купирования сильной и средней боли в целом. Препараты на основе ТТХ (моно- и многокомпонентные, в зависимости от фармацевтической задачи) являются уникальной инновацией на фоне всех имеющихся и перспективных ненаркотических анальгетиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. R.J. Gatchel, I.Z. Schultz. Handbook of Musculoskeletal Pain and Disability Disorders in the Workplace. – NY: Springer Science & Business Media, 2014. 509 p.
2. Report to the Ranking Member, Committee on Veterans' Affairs, House of Representatives. DOD AND VA HEALTH CARE Medication Needs during Transitions May Not Be Managed for All Servicemembers. GAO-13-26. 2012.
3. E. Wax-Thibodeaux. New rules on narcotic painkillers cause grief for veterans and VA // The Washington Post. 18.02.2015.
4. А.Д. Каприн, Г.Р. Абузарова. Фармакотерапия онкологической боли в России. Реальность и перспективы // Материалы Международного медицинского конгресса «Паллиативная медицина в здравоохранении Российской Федерации и стран СНГ». 2014.
5. О.И. Усиенко. Проблемы доступности наркотических анальгетиков для лечения хронического болевого синдрома у инкурабельных онкологических больных. 2010. URL: http://www.pallcare.ru/ru/?p=news&id=1265443043 (дата обращения 12.01.2016).
6. HORIZON 2020 WORK PROGRAMME 2014–2015. Health, demographic change and wellbeing. European Commission. European Union. 2014.
7. Thomson Reuters Integrity. URL: http://ip-science.thomsonreuters.com/ pharma/integrity_whatsnew/ (дата обращения 10.10.2015).
8. Comparison Study of Liquid and Lyophilized Formulations of Subcutaneous Tetrodotoxin (TTX) in Healthy Volunteers. Wex Pharmaceuticals Inc. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01527734. 2012.
9. G. Varrassi. Severe chronic pain – the reality of treatment in Europe // Curr Med Res Opin. 2011. № 27(10). P. 2063-2064.
10. C. Buckenmaier, L. Bleckner. Military advanced regional anesthesia and analgesia handbook. – N.Y.: Borden Institute Government Printing Office, 2009. 316 p.
11. R. Thomas. Pain Management Task Force: Final Report. – NY: DIANE Publishing, 2011. 160 p.
12. L. Manchikanti, S. Helm 2nd, B. Fellows, J.W. Janata, V. Pampati, J.S. Grider, M.V. Boswell. Opioid epidemic in the United States // Pain Physician. 2012. №. 15(3). P. 9–38.
13. M. Mazer-Amirshahi, K. Dewey, P.M. Mullins. Trends in opioid analgesic use for headaches in US emergency departments // Am J Emerg Med. 2014. № 32(9). P. 1068–1073.
14. M. Mazer-Amirshahi, P.M. Mullins, I. Rasooly, J. van den Anker, J.M. Pines. Rising opioid prescribing in adult U.S. emergency department visits: 2001–2010 // Acad Emerg Med. 2014. № 21(3). P. 236–243.

15. M. Mazer-Amirshahi, Mullins, I.R. Rasooly, J. van den Anker, J.M. Pines. Trends in prescription opioid use in pediatric emergency department patients // Pediatr Emerg Care. 2014. № 30(4). P. 230–235.

16. H. Song, J. Li, C.L. Lu, L. Kang, L. Xie, Y.Y. Zhang, X.B. Zhou, S. Zhong. Tetrodotoxin alleviates acute heroin withdrawal syndrome: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled study // Clin Exp Pharmacol Physiol. 2011. № 38(8). P. 510–514.

17. J. Shi, T.T. Liu, X. Wang, D.H. Epstein, L.Y. Zhao, X.L. Zhang, L. Lu. Tetrodotoxin reduces cue-induced drug craving and anxiety in abstinent heroin addicts // Pharmacol Biochem Behav. 2009. № 92(4). P. 603–607.

18. (A) N. Hagen, K. Fisher, P. Du Souich, S. Chary, D. Moulin, E. Sellers. A multi-centre open-label, dose-escalation study of intramuscular tetrodotoxin for severe cancer pain // 23rd Annu Sci Meet Am Pain Soc. Vancouver. May 6-9, 2004. Abst 304. (B) An open-label, multi-dose efficacy and safety study of intramuscular tetrodotoxin in patients with severe cancer-related pain // J Pain Symptom Manage. 2007. № 34(2). P. 171–182.

19. Tetrodotoxin is safe and effective for severe, refractory cancer pain // J Support Oncol. 2004. № 2(1). P. 18.

20. M.-O. Parat. Morphine and Metastasis. – Springer Science & Business Media, 2012. P. 151.

21. A. Hoehne, D. Behera, W.H. Parsons. A 18F-labeled saxitoxin derivative for in vivo PET-MR imaging of voltage-gated sodium channel expression following nerve injury // J Am Chem Soc. 2013. № 135(48). P. 18012–18015.

22. Патент WO 2010129864 A2. Methods and compositions for studying, imaging, and treating pain. 2010.

23. R. Sakai, G.T. Swanson. Recent Progress in Neuroactive Marine Natural Products // Nat Prod Rep. 2014. № 31(2). P. 273–309.

24. F. Zhang, X. Xu, T. Li, Zh. Liu. Shellfish Toxins Targeting Voltage-Gated Sodium Channels // Mar. Drugs. 2013. V. 11. P. 4698–4723.

25. Патент US 8377951. N.A. Wilson. Transdermal administration of phycotoxins. 2013.

26. G. Kuthiala, G. Chaudhary. Ropivacaine: A review of its pharmacology and clinical use // Indian J Anaesth. 2011. № 55(2). P. 104–110.

27. S.J. Bajwa, J. Kaur. Clinical profile of levobupivacaine in regional anesthesia: A systematic review // J Anaesthesiol Clin Pharmacol. 2013. № 29(4). P. 530–539.

28. A.J. Rodrı´guez-Navarro, Ch.B. Berde, G. Wiedmaier. Comparison of Neosaxitoxin Versus Bupivacaine via Port Infiltration for Postoperative Analgesia Following Laparoscopic Cholecystectomy // Regional Anesthesia and Pain Medicine. 2011. № 2. V. 36.

29. A.J. Rodriguez-Navarro, N. Lagos, M. Lagos, I. Braghetto, A. Csendes. Neosaxitoxin as a local anesthetic: preliminary observations from a first human trial // Anesthesiology. 2007. № 106(2). P. 339–345.

30. F.R. Nieto, E.J. Cobos, M.Á. Tejada, C. Sánchez-Fernández, R. González-Cano, C.M. Cendán. Tetrodotoxin (TTX) as a Therapeutic Agent for Pain // Mar Drugs. 2012. № 10(2). P. 281–305.

31. E.G. Moczydlowski. The molecular mystique of tetrodotoxin // Toxicon. 2013. № 63. P. 165–183.

32. A. Nardi, N. Damann, T. Hertrampf, A. Kless. Advances in Targeting Voltage-Gated Sodium Channels with Small Molecules // ChemMedChem. Special Issue: Ion Channel Drug Discovery. 2012. V. 7. Is. 10. P. 1712–1740.

33. A.R. Harmer, J.-P. Valentin, C.E. Pollard. On the relationship between block of the cardiac Na+ channel and drug-induced prolongation of the QRS complex // British Journal of Pharmacology. 2011. V. 164. Is. 2.

34. H. Zhang. Validation of IonWorks Quattro Assays for Screening of State-Dependent Nav1.7 Blockers // Neuroscience Discovery. 2008. URL: http://www.aurorabiomed.com/download/presentations/HowardZhang.pdf (дата обращения 12.01.2016).

35. Sh.-W. Yang, G.D. Ho, D. Tulshian. Bioavailable pyrrolo-benzo-1,4-diazines as Nav1.7 sodium channel blockers for the treatment of pain // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014. № 24. P. 4958–4962.

36. S.K.G. Maier, R.E. Westenbroek, K.A. Schenkman. An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart // PNAS. 2002. № 6. V. 99. P. 4073–4078.

37. (A) G.P. Rossini. Toxins and Biologically Active Compounds from Microalgae: Biological Effects and Risk Management, т. 1. – NY: CRC Press, 2014. 542 p. (B) Gian Paolo Rossini. Toxins and Biologically Active Compounds from Microalgae: Biological Effects and Risk Management, т. 2. – NY: CRC Press, 2014. 700 p.

38. W.J. Brackenbury. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. Channels 6:5. – Austin, US: Landes Bioscience, 2012. P. 352–361.

39. P.U. Onganer, M.B. Djamgoz. Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na(+) channel expression

in vitro // J. Membr. Biol. 2005. № 204. P. 67–75. URL: http://dx.doi.org/10.1007/s00232-005-0747-6 (дата обращения 12.01.2016).

40. S.P. Fraser, J.K. Diss, L.J. Lloyd, F. Pani, A.M. Chioni, A.J. George et al. T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na+ channel activity // FEBS Lett. 2004. № 569. P. 191-194. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.05.063 (дата обращения 12.01.2016).
41. S.P. Fraser, J.K. Diss, A.M. Chioni, M.E. Mycielska, H. Pan, R.F. Yamaci et al. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasi // Clin Cancer Res. 2005. № 11. P. 5381–5389. URL: http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327 (дата обращения 12.01.2016).
42. D. Diaz, D.M. Delgadillo, E. Hernández-Gallegos, M.E. Ramírez-Domínguez, L.M. Hinojosa, C.S. Ortiz et al. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer // J Cell Physiol. 2007. № 210. P. 469–478. URL: http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20871 (дата обращения 12.01.2016).
43. G. Fulgenzi, L. Graciotti, M. Faronato, M.V. Soldovieri, F. Miceli, S. Amoroso et al. Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility // Int J Biochem Cell Biol. 2006. № 38. P. 1146–1159. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2005.12.003 (дата обращения 12.01.2016).
44. S. Roger, J. Rollin, A. Barascu, P. Besson, P.I. Raynal, S. Iochmann et al. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-smallcell lung cancer cell lines // Int J Biochem Cell Biol. 2007. № 39. P. 774-786. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.12.007 (дата обращения 12.01.2016).
45. R. Gao, Y. Shen, J. Cai, M. Lei, Z. Wang. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer // Oncol Rep. 2010. № 23. P. 1293–1299.
46. J.K. Diss, S.N. Archer, J. Hirano, S.P. Fraser, M.B. Djamgoz. Expression profiles of voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines // Prostate. 2001. № 48. P. 165–78. URL: http://dx.doi.org/10.1002/pros.1095 (дата обращения 12.01.2016).
47. E. Hernandez-Plata, C.S. Ortiz, B. Marquina-Castillo, I. Medina-Martinez, A. Alfaro, J. Berumen et al. Overexpression of NaV 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer // Int J Cancer. 2012. № 130. P. 2013–2023. URL: http://dx.doi.org/10.1002/ijc.26210 (дата обращения 12.01.2016).
48. M.D. Carrithers, G. Chatterjee, L.M. Carrithers, R. Offoha, U. Iheagwara, C. Rahner et al. Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A // J Biol Chem. 2009. № 284. P. 8114–8126. URL: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M801892200 (дата обращения 12.01.2016).
49. C.D. House, C.J. Vaske, A.M. Schwartz, V. Obias, B. Frank, T. Luu et al. Voltage-gated Na+ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion // Cancer Res. 2010. № 70. P. 6957–6967. URL: http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1169 (дата обращения 12.01.2016).
50. S.W. Ou, A. Kameyama, L.Y. Hao, M. Horiuchi, E. Minobe, W.Y. Wang et al. Tetrodotoxin-resistant Na+ channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A // Eur J Neurosci. 2005. № 22. P. 793–801. URL: http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04280.x (дата обращения 12.01.2016).
51. J.K. Diss, D. Stewart, S.P. Fraser, J.A. Black, S. Dib-Hajj, S.G. Waxman et al. Expression of skeletal muscletype voltage-gated Na+ channel in rat and human prostate cancer cell lines // FEBS Lett. 1998. № 427. P. 5–10. URL: http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00378-0 (дата обращения 12.01.2016).
52. B. Shan, M. Dong, H. Tang1, N. Wang et al. Voltagegated sodium channels were differentially expressed in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostate cancer cells // Oncology Letters. 2014. № 8. P. 345–350.
53. H. Smith, S. Passik. Pain and Chemical Dependency. – Oxford: Oxford University Press, 2008. 448 c.
54. Сайт WEX Pharmaceuticals Inc. URL: www.wexpharma.com (дата обращения 15.10.2014).
55. J. Lago, L.P. Rodríguez, L. Blanco, J.M. Vieites, A.G. Cabado. Review Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses // Mar. Drugs. 2015. № 13. P. 6384–6406.
56. Ch.B. Berde, U. Athiraman, B. Yahalom, D. Zurakowski, G. Corfas, C. Bognet. Tetrodotoxin-Bupivacaine-Epinephrine Combinations for Prolonged Local Anesthesia // Mar. Drugs. 2011. № 9. P. 2717–2728.
57. Патент US 8486901. Sodium channel blocking compounds tetrodotoxin galactopyranosides. Заявитель Wex Medical Limited. – Заявл. 26.06.12; опубл. 10.09.13.
58. V. Bane, M. Lehane, M. Dikshit et al. Tetrodotoxin: Chemistry, Toxicity, Source, Distribution and Detection // Toxins. 2014. № 6. P. 693–755.

Соорганизаторы:

Ассоциация российских фармацевтических производителей «За благо здоровья россиян»

AIPM Association of International Pharmaceutical Manufacturers — Ассоциация международных фармацевтических производителей

GROUP DSM

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И МЕДИЦИНСКОГО МЕНЕДЖМЕНТА ДЕПАРТАМЕНТА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

Генеральный информационный партнер:

Фармацевтический ВЕСТНИК

СОВМЕСТНЫЙ ПРОЕКТ

VIII КОНФЕРЕНЦИЯ

«Государственное регулирование и российская фармпромышленность – 2016: ПРОДОЛЖЕНИЕ ДИАЛОГА»

КЛЮЧЕВАЯ ТЕМА: Новая нормативная база, регулирующая обращение лекарственных средств, и ее правоприменение на общем рынке ЕАЭС

- **Регистрация лекарственных средств в ЕАЭС:** *два уровня, две модели.*
- **Взаимное признание:** *Что признается? Кем признается? С чего все начинается?*
- **Государственные закупки лекарственных средств в странах-членах ЕАЭС.** *Что общего? В чем различия? Протекционизм явный и скрытый.*
- **Конкуренция на фармрынках ЕАЭС.** *Здоровая конкуренция на здоровом рынке. Реклама: что можно? Как можно? Сколько можно?*
- **Взаимодействие регуляторов и отрасли.** *«Когда мы едины, мы непобедимы!», «Один в поле не воин», «У семи нянек дитя без глаза» и другие народные афоризмы о фармацевтическом рынке ЕАЭС.*

Приглашены для выступления:

- Государственная Дума Федерального Собрания Российской Федерации
- Министерство здравоохранения Российской Федерации
- Министерство промышленности и торговли Российской Федерации
- Министерство экономического развития Российской Федерации
- Евразийская экономическая комиссия
- Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения
- Федеральная антимонопольная служба России
- Федеральная служба Российской Федерации по контролю за оборотом наркотиков
- Торгово-промышленная палата Российской Федерации
- Российский союз промышленников и предпринимателей
- Министерства здравоохранения стран-членов ЕАЭС
- Представители органов здравоохранения субъектов РФ
- Экспертные организации
- Отраслевые объединения и профессиональные союзы.



31 марта 2016 г., г. Москва, бизнес-отель «Бородино»

Регистрация заявок:

АРФП: Гульнара Долотказина, buhgg@arpm-org.ru
Ламан Лалаева, lalaeva@arpm-org.ru

Информационные партнеры:

Фармацевтическая промышленность www.arfp.ru

Аптечный союз

Технический научно-практический журнал для специалистов в сфере здравоохранения и фармацевтики ВЕСТНИК РОСЗДРАВНАДЗОРА

pharmtech & ingredients

РЕМЕДИУМ

АПТЕКАРЬ

Московские аптеки

VADEMECUM

Аптечный бизнес

Медицинский вестник

Новости GMP

УДК 612.07

1 – ЗАО «БИОКАД», 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, Петродворцовый район, п. Стрельна, ул. Связи, 34, лит. А

2– ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, Россия, 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
Тел.: 8 (921) 780 85 91

ПРОЦЕДУРА ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВЫБОРА ПОСТАВЩИКОВ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

С.А. Зайцев[1]*, А.В. Басевич[2], А.О. Хрусталева[1]

Резюме. В работе продемонстрировано практическое применение разработанной процедуры предварительного выбора поставщиков активной фармацевтической субстанции для производства лекарственных препаратов с применением инструментов анализа рисков. Процедура позволяет систематизировать процесс выбора поставщиков, снизить риск приобретения субстанции нефармакопейного качества, сформировать обоснованный список производителей для проведения аудита их производственных площадок, минимизировать затраты стоимостных, временных и трудовых ресурсов на квалификацию производителей.

Ключевые слова: анализ поставщиков, критерий выбора, уровни критериев выбора, аудит производственных площадок, процедура квалификации производителей субстанции.

THE PROCEDURE OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT SUPPLIERS PRELIMINARY CHOICE FOR MEDICINE MANUFACTURE

S.A. Zaitsev[1]*, A.V. Basevich[2], A.O. Hrustaleva[1]

Abstract. The paper demonstrates application of the newly developed procedure for pre-selection of suppliers of active pharmaceutical ingredient to manufacture of drugs using the tools of risk analysis. The procedure allows to organize the process of selecting suppliers, to reduce the risk of acquiring the substance non-pharmacopoeia quality, to minimize the consumption of cost, time and manpower resources for qualifying manufacturers, to form a reasonable list of manufacturers to audit their production sites.

Keywords: analysis of suppliers, selection criteria, selection criteria levels, audit of production facilities, the procedure manufacturer ingredient qualification.

ВВЕДЕНИЕ

Тема выбора поставщиков активных фармацевтических субстанций (АФС) для производства воспроизведенных лекарственных препаратов является критической для производителей неполного производственного цикла и одним из основных этапов при инспектировании фармацевтических производств.

Производитель лекарственных препаратов отвечает за безопасность, эффективность и качество продукта, который он производит. В большей степени качество конечного продукта зависит от качества исходных материалов. Наиболее критичным исходным материалом для производства лекарственного препарата с точки зрения его влияния на качество готового продукта является АФС [1]; на основании этого в системе менеджмента качества предприятия должно быть уделено особое внимание процессу выбора поставщиков АФС еще до стадий проведения аудита производственных площадок и квалификации производителей АФС.

Поэтому целью настоящей работы является демонстрация практического применения вновь разработанной процедуры предварительного выбора поставщиков АФС. Процедура позволяет систематизировать подход к выбору поставщиков, сфокусировать свое внимание на производителях, которые представляют наибольший риск, обозначить критические области для более детального анализа рисков, систематизировать процесс управления рисками снижения качества, исключить производителей из списка потенциальных поставщиков, если риск снижения качества слишком высокий, выбрать из множества производителей субстанции объекты для аудита производственных площадок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлены три уровня критериев выбора поставщиков АФС, полученные методом ранжирования в соответствии с руководством ICH Q9 [2].

Анализ образцов субстанции на соответствие заявленным критериям при-

емлемости, предоставленных потенциальными поставщиками АФС, осуществлялся в соответствии с показателями качества и методами анализа, представленными в таблице 1.

Таблица 1.

Показатели качества АФС и методы анализа

№ п/п	Показатели	Метод	Аналитическое оборудование
1	Описание	Визуальный	Неприменимо
2	Растворимость	ГФ XII [3]	Неприменимо
3	Подлинность, метод 1	ИК-спектроскопия	ИК-Фурье спектрометр (ООО «Инфраспек», Россия)
4	Подлинность, метод 2	ВЭЖХ	Жидкостной хроматограф с УФ-детектором (Agilent Technologies, США)
5	Прозрачность	В соответствии с ГФ XII [3]	Неприменимо
6	Цветность	В соответствии с ГФ XII [3]	Неприменимо
7	Посторонние примеси	ВЭЖХ	Жидкостной хроматограф с УФ-детектором (Agilent Technologies, США)
8	Сульфатная зола	В соответствии с ГФ XII [3]	Муфельная печь (ЗАО «О.З. ВНИИЭТО», Россия)
9	Тяжелые металлы	В соответствии с ГФ XII [3]	Неприменимо
10	Вода	Метод К. Фишера	Кулонометрический титратор (Mettler Toledo, Швейцария)
11	Остаточные органические растворители	ГЭЖХ	Газовый хроматограф с ПИД (Agilent Technologies, США)
12	Количественное определение	ВЭЖХ	Жидкостной хроматограф с УФ-детектором (Agilent Technologies, США)
13	Микробиологическая чистота	В соответствии с ГФ XII [3]	Неприменимо

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее была разработана процедура предварительного выбора (по документам) поставщиков АФС [4], которая включает три уровня в общей схеме процедуры выбора поставщиков, представленной на рисунке 1.

Каждый потенциальный поставщик АФС рассматривается по первому (ключевому) уровню критериев выбора. На этом этапе у производителей запра-



Рисунок 1. Общая схема процедуры выбора поставщиков

шивается лицензия на производство субстанции (ЛП), сертификат системы качества (GMP), спецификация на субстанцию и типичный сертификат анализа (СОА), аналитические методики (АМ), описание технологического процесса и критические точки производства (ТП), отчет по стабильности субстанции на протяжении всего срока годности и условия хранения (УХ), описание упаковки и маркировки, паспорт безопасности (MSDS), сертификат, подтверждающий отсутствие агентов трансмиссивной губчатой энцефалопатии (TSE / BSE).

Специалистами ответственных подразделений предприятия проводится оценка предоставленных данных на полноту, достоверность, соответствие информации нормативным документам и руководствам рекомендательного характера.

Если производитель АФС отвечает критериям выбора первого уровня, то у него запрашивается образец субстанции для проведения контроля качества. При положительном результате контроля поставщик рассматривается по двум последующим уровням критериев выбора. Поставщики АФС, которые не удовлетворяют критериям первого уровня и/или образец их субстанции не соответствует заявленным требованиям, не оцениваются по критериям второго и третьего уровней. Критерии выбора второго, третьего уровней и их обоснование представлены в таблице 2.

Последовательно на каждом уровне соотносятся данные производителя с критериями выбора. Если производитель им не удовлетворяет, то рассмотрение по критериям следующего уровня не проводится и производитель исключается из списка потенциальных поставщиков АФС.

Для демонстрации практического применения процедуры предварительного выбора поставщиков АФС по трем уровням критериев выбора использовались данные, предоставленные реальными производителями субстанции по запросу ЗАО «БИОКАД».

В соответствии с политикой компании информация по МНН субстанции и названию производителей является конфиденциальной, поэтому в настоящей работе приняты условные обозначения объектов исследования: А – МНН субстанции, вместо названий производителей субстанции использованы буквенные обозначения.

Таблица 2.

Критерии предварительного выбора второго и третьего уровней

Критерии выбора второго уровня		
1	Мастер-файл на субстанцию (ASMF) и история изменений	Active Substance Master File (ASMF) – документ, который содержит полную информацию об АФС производителя. Он включает конфиденциальную детализированную информацию о производстве, процессах или статьях, которые используются при производстве, упаковке и хранении продукта [5]. Документ позволяет детально изучать исходные материалы и сырье, процесс производства и контроль качества АФС потенциального поставщика.
2	Аккредитация лаборатории ОКК	Наличие сертификата ISO/IEC 17025 или аналогичного подтверждает техническую компетентность лаборатории ОКК производителя, повышая надежность результатов испытаний АФС при выпуске [6].
3	Планы (отчеты) валидации (верификации) очистки	Наличие документов по валидации очистки позволяет оценить методы очистки для исключения перекрестной контаминации готового продукта.
4	История аудитов и инспекций	Оцениваются история внешних и внутренних инспекций, выявленные отклонения. Также оценивается история аудитов производственной площадки производителя другими компаниями. Наличие большого списка проведенных и/или запланированных аудитов говорит об открытости производителя, готовности к сотрудничеству.
5	Мониторинг поставок	Оценивается наличие у производителя инструментов для отслеживания и оценки эффективности и безопасности поставок, «прозрачность» источников поставок. Неэффективные поставки исходных материалов могут стать причиной задержки производства АФС и/или производства АФС ненадлежащего качества.
Критерии выбора третьего уровня		
6	Цена	Проводится исследование структуры цены АФС, изучается корреляция между ценой, качеством АФС, особенностями производства, страной происхождения, источниками исходных материалов и сырья, объемом продаж. Устанавливается наличие или отсутствие торговой скидки, демпинговых цен.
7	Мощность и продолжительность производства	Запрашивается информация о максимальном и минимальном размере разовой поставки АФС, типичном размере серий, мощности производства. Наличие этой информации позволяет сопоставить план производства препарата с поставками АФС.
8	Стабильность компании	Для долговременного сотрудничества и работы на перспективу с поставщиком АФС необходимо оценить стабильность компании в стратегическом плане по показателям финансовой устойчивости и данным рейтинговых агентств.
9	Обращение с отзывами и жалобами	Наличие процедуры по обращению с отзывами и жалобами позволяет оценить готовность производителя к постоянному улучшению качества своего продукта.
10	Обратная связь и коммуникации	Быстрая обратная связь и оперативное удовлетворение основных и/или дополнительных запросов повышает эффективность сотрудничества.

Список производителей субстанции А и критерии выбора первого уровня представлены в таблице 3.

На основании анализа данных, представленных в таблице 3, производители В (Китай), Н (Китай), К (Индия), L (Германия) отвечают всем критериям выбора первого уровня, поэтому у них были запрошены образцы для проведения контроля качества и сопоставления результатов анализа с предоставленными сертификатами анализа.

Результаты контроля качества образцов субстанций производителей В (Китай), Н (Китай), К (Индия), L (Германия) представлены в таблице 4 [см. С. 212–213].

На основании анализа данных, представленных в таблице 4, по результатам контроля качества образцов из дальнейшего рассмотрения исключаются Н (Китай) и К (Индия). Образцы субстанций этих производителей не соответствуют спецификации по показателю посторонние примеси [единичные неидентифицированные примеси выше критерия приемлемости (не более 0,1%): 0,12% у производителя Н (Китай), и 0,38% у производителя К (Индия)]. Производители В (Китай), L (Германия) отвечают всем критериям выбора первого уровня, образцы субстанций этих производителей соответствуют норме по всем показателям качества, поэтому они были рассмотрены по критериям второго и третьего уровней.

В таблице 5 представлена информация по производителям В (Китай), L (Германия), относящаяся ко второму и третьему уровням предварительного выбора.

Таблица 3.

Чек-лист первого уровня критериев выбора поставщиков

№ п/п	Производитель	Критерии предварительного выбора первого уровня								
		ЛП	GMP	СОА	АМ	ТП	УХ	УМ	MSDS	TSE
1	B, Китай	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	C, Китай	+	–	+	+	+	+	+	+	–
3	D, Индия	+	+	+	+	+	+	+	+	–
4	E, Китай	+	+	+	–	–	–	–	–	–
5	F, Китай	+	–	+	–	–	–	–	–	–
6	G, Индия	+	+	+	+	+	+	+	+	–
7	H, Китай	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	I, Китай	+	–	+	–	–	–	–	–	–
9	J, Китай	+	+	+	–	–	–	–	–	–
10	K, Индия	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	L, Германия	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	M, Китай	+	–	+	–	–	–	–	–	–
13	N, Индия	+	–	+	+	+	+	+	+	–
14	O, Индия	+	+	+	+	+	+	+	+	–
15	P, Индия	+	–	+	–	–	–	–	–	–
16	Q, Индия	+	–	+	+	+	+	+	+	–
17	R, Индия	+	+	+	+	+	+	+	+	–
18	S, Индия	+	+	+	+	+	+	+	+	–
19	T, Индия	+	+	+	+	+	+	+	+	–
20	U, Индия	+	+	+	–	+	+	+	+	+
21	V, Индия	+	+	+	+	+	+	+	+	–

Примечание: «+» – наличие, предоставление по запросу и положительное экспертное заключение; «–» – отсутствие, и/или непредоставление по запросу, и/или отрицательное экспертное заключение.

Таблица 5.

Чек-лист второго и третьего уровней критериев выбора поставщиков

Уровни	Критерии выбора	Производитель B	Производитель L
Первый уровень	Мастер-файл на субстанцию (ASMF) и история изменений	+	+
	Аккредитация лаборатории ОКК	+	+
	Планы (отчеты) валидации (верификации) очистки	+	+
	История аудитов и инспекций	+	+
	Мониторинг поставок	+	+
Второй уровень	Цена	+	+
	Мощность и продолжительность производства	+	+
	Стабильность компании	+	+
	Обращение с отзывами и жалобами	+	+
	Обратная связь и коммуникации	+	+

Примечание: «+» – наличие, предоставление по запросу и положительное экспертное заключение; «-» – отсутствие, и/или непредоставление по запросу, и/или отрицательное экспертное заключение.

На основании анализа данных, представленных в таблице 5, производители B (Китай), L (Германия) отвечают всем критериям выбора второго и третьего уровней, поэтому они могут рассматриваться как потенциальные кандидаты для аудита их производственных площадок с последующей квалификацией.

Таблица 4.

Результаты контроля качества образцов субстанций

Производитель		B, Китай		L, Германия		H, Китай		K, Индия	
Серия исследуемой субстанции		14030421		1301636		20130103		16120905	
Показатели качества	Требования внутренней спецификации	Сертификат	Контроль	Сертификат	Контроль	Сертификат	Контроль	Сертификат	Контроль
Описание	Белый или почти белый кристаллический порошок	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Растворимость	Легко растворим в метаноле, этаноле 96%, ацетоне, хлороформе, практически нерастворим в воде	Соотв.	Соотв.	–	Соотв.	–	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Подлинность методом ИК-спектроскопии	ИК-спектр испытуемого образца должен соответствовать ИК-спектру стандартного образца	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Подлинность методом ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Прозрачность	0,1% в этаноле 96% д.б. прозрачным или с Эталоном I	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	–	Соотв.	–	Соотв.
Цветность	0,1% в этаноле 96% д.б. бесцветным или с Эталоном B9	Соотв.	Соотв.	–	Соотв.	–	Соотв.	–	Соотв.
Посторонние примеси	Примесь 1 не более 0,1%	–	–	0,04%	< 0,05%	–	–	–	–
	Примесь 2 не более 0,2%	0,02%	0,017%	–	< 0,05%	–	0,19%	–	0,04%
	Примесь 3 не более 0,2%	Н/о	Н/о	–	Н/о	–	Н/о	–	Н/о
	Примесь 4 не более 0,1%	Н/о	0,005%	–	Н/о	–	Н/о	–	Н/о
	Примесь 5 не более 0,1%	Н/о	Н/о	–	Н/о	–	Н/о	–	Н/о
	Единичной примеси не более 0,1%	0,05%	0,04%	0,04%	< 0,05%	0,1%	0,12%	0,1%	0,38%
	Сумма неидентифицированных примесей не более 0,2%	0,1%	0,06%	–	< 0,05%	–	0,32%	–	0,45%
	Сумма всех примесей не более 0,5%	0,1	0,09%	0,1%	< 0,05%	0,1%	0,51%	0,21%	0,49%

Производитель		B, Китай		L, Германия		H, Китай		K, Индия	
Серия исследуемой субстанции		14030421		1301636		20130103		16120905	
Показатели качества	Требования внутренней спецификации	Сертификат	Контроль	Сертификат	Контроль	Сертификат	Контроль	Сертификат	Контроль
Сульфатная зола	Не более 0,1%	0,1%	0,05%	0,04%	0,04%	0,02%	–	0,04%	0,09%
Тяжелые металлы	Не более 0,001%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	–	Соотв.	Соотв.
Вода	Не более 0,3%	0,01%	0,05%	0,03%	–	–	0,04%	0,13%	0,08%
Остаточные органические растворители	Хлороформ – не более 0,006%	Н/о	–	< 0,0001%	Н/о	–	–	–	Н/о
	Этанол – не более 0,5%	0,2%	–	–	–	Н/о	Н/о	–	Н/о
	Метиленхлорид – не более 0,06%	0,06%	–	< 0,0001%	Н/о	–	–	–	Н/о
	Циклогексан – не более 0,388%	0,29%	–	–	–	Соотв.	0,00015%	< 0,388%	0,005%
	Этилацетат – не более 0,5%	Н/о	–	–	–	Соотв.	0,012%	< 0,5%	0,0002%
	Метанол – не более 0,3%	0,0001%	–	–	–	–	–	< 0,3%	Н/о
	NN-диметилформамид – не более 0,088%	0,005%	–	–	–	Соотв.	Н/о	< 0,088	Н/о
	Четырехлористый углерод – не более 0,0004%	–	–	< 0,0001%	0,0002%	–	–	–	–
	Терабутилметиловый эфир – не более 0,5%	–	–	0,0049%	0,002%	–	–	–	–
	Изопропанол – не более 0,5%	–	–	< 0,0001%	Н/о	–	–	–	–
	Изопропилацетат – не более 0,5%	–	–	< 0,0001%	Н/о	–	–	–	–
	n-гексан – не более 0,029%	–	–	–	–	Соотв.	0,014%	–	–
	Ацетонитрил – не более 0,041%	–	–	–	–	Н/о	Н/о	–	–
	Изопропиловый эфир – не более 0,5%	–	–	–	–	Соотв.	Н/о	–	–
Количественное определение	От 98% до 102% на безводное, свободное от остаточных органических растворителей вещество	101,6%	100,5%	99,9%	100,8%	99,9%	98,5%	99,4%	99,3%
Микробиологическая чистота	Грибов не более 100 КОЕ на 1 г. Бактерий не более 1000 КОЕ на 1 г. Отсутствие *E.coli*	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	–	Соотв.

Примечание: «–» – отсутствие информации, и/или неприменимо, и/или анализ не проводился; н/о – не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлена впервые разработанная процедура предварительного выбора производителей АФС с обоснованием критериев выбора второго и третьего уровней, продемонстрировано практическое применение трехуровневого подхода к выбору поставщиков субстанции А.

В рамках процедуры на основании анализа данных и результатов входного контроля образцов субстанций, предоставленных потенциальными поставщиками, из 21 производителя было выбрано два объекта [B (Китай), L (Германия)] для аудита их производственных площадок с последующей квалификацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Supplier Qualification & Management Guideline. Active Pharmaceutical Ingredients Committee. 2009. URL: http://apic.cefic.org/pub/GuidelineSupplierQualification_200912_final.pdf (дата обращения 16.01.2015).
2. Quality Guidelines. Q9 Quality Risk Management. The International Conference on Harmonisation. 2005. – URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf (дата обращения 27.02.2015).
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. Издание XII. Ч. 1. – М.: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. 704 с.
4. С.А. Зайцев. Процедура предварительного выбора поставщиков активной фармацевтической субстанции для производства лекарственных препаратов // Сборник материалов V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 20-21 апреля 2015 г. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2015. С. 277–280.
5. Drug Master Files: Guidelines. Food and Drug Administration. 2005. URL:http://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm122886.htm (дата обращения 15.01.2015).
6. ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. – Минск: Стандартинформ, 2010. 62 с.



Оптимизируйте Ваши биопроцессы с биореакторами INFORS HT!

- Возможность дальнейшего масштабирования
- Оптимизированное управление для быстрого получения результатов
- Ориентированная на конкретное применение гибкая настройка
- Сенсорный дисплей и встроенный OPC-сервер
- Автоматическая очистка (CIP) и стерилизация (SIP) биореакторов объемом от 0,5 л до 1000 л

QUALITY – MADE IN SWITZERLAND

INFORS HT

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

8 800 700–96–26
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)

info@phct.ru
www.phct.ru

Pharmcontract group of companies

Контроль качества на фармацевтическом производстве: воздух, вода, готовый продукт

BECKMAN COULTER
Life Sciences

Компания Beckman Coulter Life Sciences – новатор в области характеризации и подсчета частиц. С момента выхода первой модели счетчика Культера в 1956 году компанией было выпущено более 40 моделей приборов для научных исследований и фармацевтических производств.

Портфолио компании включает приборы для анализа размеров частиц методом лазерной дифракции (LS 13 320), количества и размеров частиц по принципу Культера (Multisizer, Z), молекулярного веса и дзета-потенциала (DelsaMax) и жизнеспособности клеток (Vi-Cell XR).

С 2015 года компания предлагает приборы серии MET ONE, HIAC и Anatel для контроля воздуха в чистых помещениях, качества очищенной воды (PW, HPW), воды для инъекций (WFI), а также готовых лекарственных препаратов на соответствие современным стандартам фармакопеи.



MET ONE 3400 – контроль воздуха в чистых помещениях

Портативные счетчики аэрозольных частиц MET ONE 3400 соответствуют стандарту ISO 14644 и разработаны для мониторинга и классификации чистых помещений. Вы оцените удобство электронного документооборота: больше не нужно распечатывать, сканировать и переписывать данные вручную! MET ONE позволяет выводить отчеты в формате PDF и передавать их по Wi-Fi, Ethernet или USB.



QbD 1200 – анализатор общего органического углерода

Новый анализатор общего органического углерода (TOC) QbD 1200 был разработан специально для исследования качества воды для инъекций и очищенной воды (диапазон измерения 0.4 ppb – 100 000 ppb). Программное обеспечение соответствует нормативам 21 CFR часть 11 и стандартам фармакопеи. QbD 1200 невероятно прост в работе и обслуживании и гарантирует получение стабильных результатов без перекрестной контаминации образцов. При этом для работы требуется всего один реактив!



HIAC 9703+ – контроль содержания невидимых частиц

HIAC 9703+ основан на методе световой блокады и предназначен для определения количества и размера частиц при проверке качества ультрачистой воды (HPW), воды для инъекций (WFI), а также инфузионных препаратов (USP <788>) и офтальмологических растворов (USP <789>). Анализатор умеет работать как с небольшими объемами (1 мл), так и с объемами превышающими 1000 мл. Аналитический диапазон размеров – от 0.5 до 500 мкм.

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
8 (800) 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
www.phct-group.com
www.phct.ru
Pharmcontract group of companies

УДК 615.1, 615.47

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ КОНТРОЛИРУЕМЫХ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ ПРЕПАРАТОВ АНАЛЬГЕТИКОВ

А.В. Соснов[1]*, С.С. Голубев[2], Б.С. Пункевич[1], С.В. Садовников[1], Е.М. Загребин[1], И.С. Родина[1], Ф.М. Семченко[3], А.А. Соснова[3]

1 – ОАО «Федеральный научно-технический центр метрологии систем экологического контроля «Инверсия» (ОАО ФНТЦ «Инверсия»), Россия, 107031 Москва, ул. Рождественка, д. 27

2 – Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт), Россия, 119049, г. Москва, Ленинский пр., 9

3 – ФГУП «Государственный завод медицинских препаратов» (ФГУП «ГосЗМП»), Россия, 111024, г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 23

1 – Federal S&T Center «Inversiya», 27, Rozdestvenka str., Moscow, 107031, Russia

2 – Federal Agency on Technical Regulation and Metrology (Rosstandart), 9, Leninskiy pr., Moscow, 115093, Russia

3 – The Federal State Unitary Enterprise State Pharmaceutical Plant (FSUE «GosZMP»), 23, Entuziastov highway, Moscow, 111024, Russia

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

Резюме. В статье представлена проблема отсутствия в РФ государственных стандартных образцов (ГСО) состава контролируемых сильнодействующих компонентов фармацевтических препаратов (в первую очередь наркотических и психотропных) и предложен алгоритм ее решения. При проведении любых количественных исследований веществ данного типа, согласно нормативным документам по обеспечению единства измерений в РФ, требуется использование ГСО. Отсутствие данных ГСО не позволяет: проводить юридически значимую оценку качества изделий медицинского назначения, обеспечивать безопасность работ с фармсубстанциями веществ, относящихся к первому классу опасности, проводить количественные экспертно-криминалистические анализы с использованием инструментальных методов и т.д. Разработка ГСО состава контролируемых веществ ограниченного использования (ГСО КВ) предполагается в рамках технологической кооперации организаций (лабораторий), имеющих необходимые лицензии. Производство ГСО КВ целесообразно организовать на одном специализированном объекте, на котором ОАО ФНТЦ «Инверсия» уже выпускает ГСО состава токсичных химикатов (ГСО ТХ). Создание и внедрение в практику ГСО КВ обеспечит научно-технический и методический задел для разработки и внедрения технологий производства сильнодействующих фармсубстанций в РФ, обеспечит решение задач в области криминалистики и химической безопасности.

Ключевые слова: стандартные образцы, ГСО, фармацевтическая субстанция, метрология, сильнодействующие контролируемые вещества, анальгетики, анестетики, наркотические препараты, психотропные препараты, количественный анализ, промышленная безопасность, качество фармпрепаратов, химическая безопасность.

REFERENCE STANDARDS OF ACTIVE INGREDIENTS OF POTENT ANALGESIC DRUGS

A.V. Sosnov[1]*, S.S. Golubev[2], B.S. Punkevich[1], S.V. Sadovnikov[1], E.M. Zagrebin[1], I.S. Rodina[1], F.M. Semchenko[3], A.A. Sosnova[3]

Abstract. The article describes acute problem – absence of reference standards (Federal Reference Standards) of controlled ingredients of some potent pharmaceuticals (especially narcotic and psychotropic substances) in Russia. Authors present an algorithm for solving this task. According to regulatory documents providing traceability and technical regulation in Russian Federation requires use of the Federal Reference Standards for any official quantitative studies of narcotic and psychotropic substances. Lack of the reference standards does not allow provide: legally meaningful assessment of quality of medical products; to ensure industrial safety of work with substances belonging to list of dangerous goods; to conduct quantitative forensic analysis using instrumental methods, etc. Development of the Federal Reference Standards should be organized in the framework of technological cooperation of organizations (laboratories) which has necessary licenses. Production of the highest quality standards should be organized on a specialized facility where Federal S&T Center "Inversiya" has already made Federal Reference Standards of toxic chemicals. Creation and introduction in practices Federal Reference Standards of the controlled substances will provide scientific, technical and methodological foundations in development and implementation technologies for production of potent pharmaceutical ingredients in Russian Federation and solutions in the field of criminology and chemical safety and security.

Keywords: reference standards, pharmaceutical substances, metrology, potent controlled substances, analgesics, anesthetics, narcotic drugs, psychotropic drugs, quantitative analysis, industrial safety, quality of pharmaceuticals, chemical safety and security.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в РФ полностью отсутствуют ГСО состава контролируемых психоактивных (наркотических и психотропных) веществ, как разрешенных для производства и ограниченного использования, так и запрещенных для оборота в РФ (ГСО веществ, запрещенных к обороту в РФ, необходимы для выполнения экпертно-криминалистических анализов) [1]. Это противоречит требованиям законодательства РФ в области обеспечения единства измерений, в частности делает невозможным получение юридически значимых результатов количественных исследований веществ данного типа и содержащих их объектов. Фактически невозможно проводить официальную оценку качества изделий медицинского назначения, обеспечивать безопасность и качество работ с фармсубстанциями веществ, относящихся к первому классу опасности, проводить количественные экспертно-криминалистические анализы и т.д. с использованием современных инструментальных методов анализа, требующих наличия ГСО при разработке методик анализа, градуировке и поверке приборов и непосредственном выполне-

нии анализов контролируемых веществ. Поэтому разработка и производство отечественных ГСО состава контролируемых веществ ограниченного использования (ГСО КВ) является первостепенной в рамках задач фармацевтической промышленности, таможенного и экспортного контроля, контроля за оборотом наркотических и психотропных веществ в РФ, а также обеспечения задач химической безопасности.

СИТУАЦИЯ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ КОНТРОЛИРУЕМЫХ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ И ДРУГИХ ПРЕПАРАТОВ

Потребность организаций РФ в государственных стандартных образцах (ГСО) определяется законами и руководящими документами в области обеспечения единства измерений в соответствии со стратегическими задачами развития экономики, задачей импортозамещения, таможенного и экспортного контроля, здравоохранения (включая охрану труда), экологии, обеспечения национальной безопасности и правопорядка. Данные задачи декларированы в государственных программах, международных соглашениях РФ, законах и других руководящих документах РФ, в разделах, относящихся к сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений. К основным законам и руководящим документам РФ, устанавливающим потребности в ГСО, относятся:

1. Федеральный закон РФ от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений» [2].
2. Федеральный закон РФ от 31 декабря 2014 г. № 488-ФЗ «О промышленной политике в Российской Федерации» [3].
3. Стратегия обеспечения единства измерений в России до 2015 года (Приказ Минпромторга России от 17.06.2009 г. № 529) [4].
4. Единый перечень измерений, относящихся к сфере государственного регулирования [5].

В соответствии с Федеральным законом от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений» (статья 8) в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений (ОЕИ) применяются стандартные образцы утвержденных типов. Тип стандартных образцов, применяемых в сфере государственного регулирования ОЕИ, подлежит обязательному утверждению (статья 12). Сфера государственного регулирования ОЕИ распространяется на измерения, к которым установлены обязательные метрологические требования и которые выполняются при:

- осуществлении деятельности в области здравоохранения;
- осуществлении ветеринарной деятельности;
- осуществлении деятельности в области охраны окружающей среды;
- осуществлении деятельности в области гражданской обороны, защиты населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера, обеспечения пожарной безопасности, безопасности людей на водных объектах;
- выполнении работ по обеспечению безопасных условий и охраны труда;
- проведении официальных спортивных соревнований, обеспечении подготовки спортсменов высокого класса;
- выполнении поручений суда, органов прокуратуры, государственных органов исполнительной власти и других видов деятельности.

В соответствии с частью 2 статьи 27 федеральные органы исполнительной власти, осуществляющие нормативно-правовое регулирование в областях деятельности, указанных выше, определяют в пределах их компетенции перечни измерений, относящихся к сфере государственного регулирования ОЕИ, по согласованию с федеральным органом исполнительной власти, осуществляющим функции по выработке государственной политики и нормативно-правовому регулированию в области ОЕИ (Минпромторг России). В настоящее время сформирован единый перечень измерений, относящихся к сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений [5].

Метрологическое обеспечение количественного химического анализа (КХА) невозможно без применения стандартных образцов состава контролируемых веществ. Основная часть стандартных образцов, разработанных и утвержденных в качестве стандартных образцов утвержденного типа Российской Федерации (ГСО), зарегистрированных в Государственном реестре утвержденных типов стандартных образцов (Реестр ГСО) и представленных в Федеральном информационном фонде, – стандартные образцы состава контролируемых веществ. На рисунке 1 приведены сведения о номенклатуре стандартных образцов в Реестре ГСО по состоянию на июнь 2015 года. Общее количество ГСО в Реестре СО – 11280 (на 06.2015).

Специфической областью ГСО являются стандартные образцы (СО) контролируемых биологически активных веществ ограниченного использования (далее ГСО КВ), поскольку:

- контролируемые вещества входят в ограничительные списки отечественных и международных документов, конвенций и соглашений (основной критерий);
- часть контролируемых веществ ограниченного применения представляет опасность в случае криминального использования;

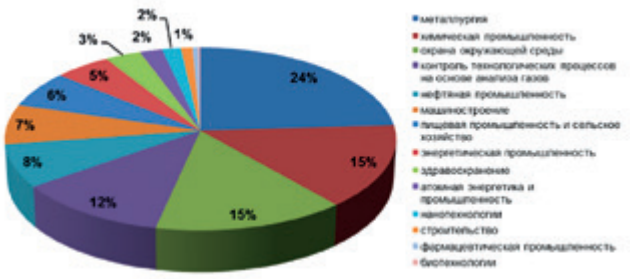


Рисунок 1. **Номенклатура ГСО в Реестре ГСО (по состоянию на июнь 2015 г.) [6]**

- производство и использование ГСО КВ требует специальных разрешений, лицензий и требований к персоналу и оборудованию;
- часть исходных реактивов для синтеза ГСО КВ включены в международные и отечественные ограничительные списки;
- коммерческая поставка ГСО КВ потребителям возможна только на основе предварительно согласованных с министерствами РФ планов поставок;
- транспортировка ГСО КВ должна выполняться только специализированными организациями с использованием спецтранспорта, в сопровождении специалистов и охраны.

Наиболее востребованной в развитых странах областью стандартных образцов состава контролируемых веществ (необходимых для промышленности, здравоохранения и обеспечения безопасности) являются наркотические и психотропные вещества, входящие в состав фармпрепаратов, например анальгетики, анестетики, анксиолитики и др., а также входящие в состав ветеринарных препаратов. Информация по ситуации с ГСО законодательно контролируемых веществ в РФ суммирована в таблице 1.

Анализ данных таблицы 1 показывает, что из всей области контролируемых в РФ сильнодействующих веществ ограниченного использования, их прекурсоров и метаболитов ГСО имеются только для небольшой части веществ, относящихся к спискам Конвенции о запрещении химического оружия [7]. Данные ГСО выпускаются ОАО ФНТЦ «Инверсия» и используются в РФ в процессе метрологического обеспечения химического разоружения [15].

Отсутствие ГСО разрешённых к ограниченному контролируемому использованию веществ – компонентов фармацевтических препаратов и их контролируемых прекурсоров и метаболитов резко осложняет контроль качества и подлинности используемых в РФ соответствующих фармпрепаратов, является препятст-

Таблица 1.

Анализ наличия утвержденных типов стандартных образцов контролируемых веществ ограниченного использования в РФ

Вид ГСО (уже имеющийся в РФ или востребованный)	Основание для ограничения или запрещения использования веществ	Область использования ГСО состава веществ	Кол-во ГСО/ веществ
ГСО токсичных химикатов (ГСО ТХ), выпускаемые ОАО ФНТЦ «Инверсия»	Списки 1 и 2 химикатов Конвенции о запрещении химического оружия (ХО) [7]	Уничтожение ХО Контроль нераспространения ХО Разработка и поверка средств измерений, индикации и защиты Научные исследования	16 типов ГСО, производятся в РФ
ГСО наркотических и психотропных веществ, разрешенных к обороту в РФ (фармсубстанции и прекурсоры)	Списки 2, 3, 4 перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в РФ [8]	Контроль фармпроизводства Контроль качества фармпрепаратов Контроль незаконного использования веществ Разработка методов анализа и контроля Неклинические и клинические исследования Научные исследования	Более 100, не имеются в РФ
ГСО наркотических и психотропных веществ, запрещенных к обороту в РФ	Список 1 перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в РФ [9]	Контроль незаконного использования веществ (включая экспертно-криминалистические исследования) Разработка методов анализа и контроля Научные исследования	Около 200, не имеются в РФ
ГСО сильнодействующих веществ, относящихся к ветеринарным препаратам, зооцидам, спайсам, допингу и др.	Различные списки контролируемых и наиболее опасных веществ, в том числе и при криминальном использовании [10–12]	Контроль незаконного использования (включая экспертно-криминалистические исследования) Противодействие терроризму Разработка методов анализа и контроля Научные исследования	Более 100, не имеются в РФ
Матричные СО, ГСО продуктов метаболизма и коньюгатов некоторых из перечисленных выше веществ	Активные фармацевтически значимые производные и метаболиты контролируемых веществ [13, 14]	Контроль качества фармпрепаратов Контроль незаконного использования веществ (включая экспертно-криминалистические исследования) Разработка методов анализа и контроля Научные исследования	Более 100, не имеются в РФ

вием для разработки и производства отечественных препаратов: анальгетиков, анестетиков, анксиолитиков, антидепрессантов, а также ряда ветеринарных препаратов. Отсутствие ГСО веществ, запрещенных к обороту в РФ, их метаболитов и матричных форм не позволяет проводить юридически значимые количественные экспертно-криминалистические исследования. Таким образом, отсутствие ГСО сильнодействующих, фармацевтически значимых веществ противоречит законодательству РФ в области обеспечении единства измерений, сдерживает развитие фармацевтики, криминалистики, негативно влияет на обеспечение безопасности населения РФ.

Имеющиеся зарубежные стандартные образцы особым образом контролируемых веществ, которые представляют интерес для возможной временной замены отечественных ГСО, можно разделить на категории согласно следующим критериям:

- сильнодействующие (включая наркотические и психотропные) вещества, включенные в международные и/или российские списки ограниченного использования или запрещённые к обороту; один из наиболее полных списков (около 400 контролируемых веществ) публикует министерство юстиции США [16];
- некоторые вещества первого класса опасности (производство которых в РФ требует использования ГСО), по совокупности токсических, физико-химических и др. свойств представляющие реальную опасность при незаконном использовании в различных формах;
- вещества, рассматриваемые в развитых странах в рамках национальных программ «Security Science» как наиболее опасные при террористическом (крупные здания, элементы инфраструктуры, системы водоснабжения и др.) и систематическом криминальном использовании;
- вещества, в отношении которых имеются ограничения на международную торговлю/поставки (как правило, прекурсоры).

С точки зрения практического использования зарубежные стандартные образцы особым образом контролируемых веществ можно классифицировать на две основные группы:

- коммерчески доступные фармакопейные стандарты, производимые различными организациями (более 10), включая European Pharmacopoeia, The United States Pharmacopeia and The National Formulary (USP–NF), British Pharmacopoeia и др.;
- стандарты для экспертно-криминалистических задач, задач экологической и химической безопасности, производимые в рамках национальных и международных программ обеспечения безопасности, например National Security Standards Program (США), CBRNE Research and Technology Initiative (CRTI, Канада и США), раздел Roadmap for harmonisation of European analytical capability for CBRN incidents программы Европейского союза Standardisation of laboratory analytical methods.

Законодательство РФ предусматривает в качестве исключения допуск к применению СО зарубежного выпуска, закупаемых в единичных экземплярах и применяемых в сферах, на которые распространяется государственный метрологический надзор и контроль, в том числе в составе комплектного оборудования. Процедуру допуска выполняет головной орган – Государственная служба стандартных образцов (ГССО) [17, 18], осуществляющая экспертизу по заявкам организаций РФ (импортеров или потребителей СО). Как показывает практика, вследствие бюрократической специфики срок получения (после оплаты) потребителем РФ зарубежных стандартных образцов психоактивных веществ ранее составлял около одного года. С введением санкций в отношении РФ покупка зарубежных стандартных образцов особым образом контролируемых веществ становится еще более сложной или невозможной в принципе. Это делает разработку и производство отечественных ГСО КВ единственно возможным решением.

СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИЕ АНАЛЬГЕТИКИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В РФ

В соответствии с рекомендациями экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) лечение опиоидными анальгетиками проводится больным с умеренным или сильным хроническим болевым синдромом в соответствии с «трехступенчатой лестницей обезболивания ВОЗ» [19]:

- 1 ступень – ненаркотический анальгетик ± адъювантное средство;
- 2 ступень – слабый опиоид ± ненаркотический анальгетик ± адъювантное средство;
- 3 ступень – средний или сильный опиоид ± ненаркотический анальгетик ± адъювантное средство.

Стратегия лечения боли при этом следующая: применение комплекса препаратов на одной ступени проводится до тех пор, пока не исчерпан эффект более слабых анальгетиков, затем переходят на следующую ступень [20].

Для сравнения эквианальгетических доз наркотических анальгетиков и мощности анальгетического эффекта препаратов для человека широко используется (особенно в паллиативной медицине) термин «эквивалент морфина» (Morphine Equivalent Dose, MED). За единицу анальгетического действия вещества или препарата принимается пероральное действие 10 мг морфина. Для каждого вещества (с учетом его способа введения в составе фармпрепарата) оценивается экви-

анальгетическая доза (мг) и относительная мощность действия в единицах MED. Так, например, для внутривенного или внутримышечного введения морфина эквианальгетическая доза составляет 3,33 мг, а относительная мощность действия составляет 3 единицы MED [21–23]. В таблице 2 представлены анальгетики, наиболее востребованные в мировой клинической практике, проведен сравнительный анализ их активности.

В качестве анальгетиков для второй ступени обезболивания ВОЗ рекомендованы (ед. MED перорально): кодеин (1/10), дигидрокодеин (1/10), декстропропоксифен (1/15), трамадол (1/10). В качестве анальгетиков для третьей ступени ВОЗ рекомендованы (ед. MED перорально): морфин (1), морфин (3 в/в, в/м), гидроморфон (5), оксикодон (1,5), бупренорфин (30–40), петидин (1/3), леворфанол (8), метадон (3–4), пентазоцин (1 внутривенно). В РФ также активно используется фентанил (50-100) и оригинальные отечественные препараты: промедол (1–1,5 MED внутримышечно) и просидол (1/3) [22, 23, 26].

Таблица 2.

Сравнительная активность (мощность действия или анальгетический потенциал), эквианальгетические дозы (эквипотенциальные обезболивающие дозы относительно 10 мг морфина перорально) и биодоступность наиболее востребованных анальгетиков, используемых в составе медицинских и/или ветеринарных препаратов [21]

Анальгетик	Мощность действия MED	Эквивалентная доза	Биодоступность
Aspirin (non-opioid)	1/360	3600 мг	100%
Ibuprofen[7] (NSAID. non-opioid)	1/222	2220 мг	87–100%
Diflunisal (NSAID. non-opioid)	1/160	1600 мг	80–90%
Naproxen[7] (NSAID. non-opioid)	1/138	1380 мг	95%
Dextropropoxyphene[8]	1/13–1/20	130–200 мг	
Codeine	1/10	180 мг (PO)	≈90%
Tramadol	1/10	>200 мг	75% (IR). 85–90% (ER)
Tapentadol	1/10	75 мг	32% (fasting)
Tilidine	1/5	50 мг	
Dihydrocodeine	1/5	50 мг	20%
Anileridine[10]	1/4	40 мг	
Alphaprodine	1/4–1/6	40–60 мг	
Pethidine (meperidine hydrochloride)	1/3	30 мг SC/I M/ IV. 300 мг PO	50–60%
Hydrocodone	1	10 мг	≥80%
Metopon	1	10 мг	
Pentazocine lactate (IV)[11]	1	10 мг SC/IV/IM. 150 мг PO	
Morphine (oral)	(1)	(10 мг) (30 мг PO)	≈25%
Oxycodone[12]	1,5	6,67 мг	≤87%
Morphine (IV/IM)	3	3,33 мг	100%
Clonitazene	3	3,33 мг	
Methadone (acute)[13][14]	3–4	2,5–3,33 мг	40–90%
Diamorphine (Heroin: IV/IM)[15]	4–5	2–2,5 мг	100%
Hydromorphone[16]	5	1,5 мг SC/IV/ IM. 7,5 мг PO	62%
Oxymorphone[17]	7	10 мг PO. 1 мг IV	10%
Methadone (chronic)[14]	2,5–5	3,33 мг	40–90%
Levorphanol[18]	8	1,3 мг	70%
7-Hydroxymitragynine	17	≈6 мг	
Buprenorphine[8]	40	0,4 мг	35–40% (SL)
Fentanyl	50–100	0,1 мг (100 мкг) IM/IV	33% (SL): 92% (TD)
Sufentanil	500–1,000	10–20 мд	
Bromadol[notes 1]	504	≈20 мкг	
Etorphine[notes 1]	1,000–3,000	3,3–10 мкг	
Etonitazene[notes 1]	2,000	5,0 мкг	
Dihydroetorphine[notes 1]	1,000–12,000	20–40 мкг	
Carfentanil [notes 1][18]	10,000–100,000	0,1–1,0 мкг	

В таблице 3 представлены анальгетики наиболее востребованные анальгетики в медицинской практике РФ. К представленному в таблице перечню можно добавить трамадол, кетамин, бупренорфин и оксибутират натрия, включенные в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения в РФ [24]. В России также активно используются оксикодон, тапентадол и гидроморфон, рекомендованный для фармакотерапии боли у детей и подростков [25] и пациентов с почечной недостаточностью [26]. Редко используются налбуфин и буторфанол в инъекционных формах [26].

Таблица 3.

Основные наркотические анальгетики и препараты на их основе, используемые в РФ [20]

МНН/Состав (русский, латынь)	Торговое наименование	Лекарственная форма
Дигидрокодеин (Dihydrocodeinum)	ДГК Континус	табл. пролонг.
Тримеперидин (Trimeperidinum)	Промедол	р-р д/и, табл.
Пропионилфенилэтоксиэтилпиперидин (Propionilphenyletoxyaethylpiperidinum)	Просидол	табл. защечные
Состав: Кодеин + Морфин + Носкапин + Папаверина гидрохлорид + Тебаин (Codeinum + Morphinum + Noscapinum + Papaverini hydrochloridum + Tebainum)	Омнопон	р-р п/к
Морфин (Morphinum)	Морфин	р-р д/и
	Морфина сульфат	р-р п/к
	МСТ Континус	капс. пролонг.
Бупренорфин (Buprenorphinum)	Бупранал	р-р д/и
	Транстек	ттс
Фентанил (Phentanylum)	Дюрогезик	ттс
	Луналдин	табл. сублингв.
	Фендивия	ТТС
	Фентадол	ТТС
	Фентанил	р-р в/в и в/м, р-р д/и

РАЗРАБОТКА И ПРОИЗВОДСТВО ГСО КОНТРОЛИРУЕМЫХ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, НАИБОЛЕЕ ВОСТРЕБОВАННЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТЬЮ

На основании проведенного авторами анализа рекомендаций по применению контролируемых анальгетиков ограниченного использования [20–26] в интересах отечественных фармпроизводителей целесообразно в первую очередь разработать и организовать выпуск 15 типов ГСО состава следующих наиболее фармакологически значимых веществ: морфина, фентанила, ремифентанила, бупренорфина, трамадола, кетамина, оксикодона, тапентадола, гидроморфона, тебаина, кодеина, носкапина, налбуфина и буторфанола, а также натрия оксибутирата. Большинство данных веществ включены в действующий перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения [24]. На втором этапе целесообразно разработать и организовать производство от нескольких десятков до ~100 типов ГСО контролируемых анальгетиков, анестетиков, анксиолитиков, антидепрессантов и других психоактивных веществ, их метаболитов и контролируемых прекурсоров. Как в интересах отечественного фармпроизводства, так и для решения экспертно-криминалистических и научных задач (НИИ, контрольные лаборатории и др.). Всего, по оценкам авторов, в ГСО КВ нуждаются более 250 организаций РФ, имеющих соответствующие лицензии.

Алгоритм процесса разработки и производства ГСО КВ представлен на рисунке 2.



Рисунок 2. Предлагаемая технологическая цепочка и система кооперации при разработке и производстве ГСО КВ [15]

Разработка ГСО контролируемых веществ предполагается в рамках технологической кооперации организаций (лабораторий), имеющих необходимые лицензии. Производство большинства ГСО КВ целесообразно организовать на одном имеющемся специализированном объекте. На данном производственном объекте ОАО ФНТЦ «Инверсия» в течение ряда лет уже производит ГСО ТХ [15], проводит исследования и разработки с целью увеличения срока годности данных ГСО, разрабатывает методики количественного определения целевых веществ в различных средах и материалах с использованием ГСО ТХ. На данном объекте целесообразно организовать производство ГСО КВ в интересах всех (более 250) организаций-потребителей РФ.

Технологическая база специализированного объекта по производству ГСО КВ должна включать:

- производство (синтез и очистку) ГСО состава контролируемых веществ;
- химико-аналитическую лабораторию для участия в разработке новых типов ГСО и контроля качества производимых ГСО;

- депозитарий для хранения контрольных образцов ГСО КВ, запасов ГСО, коллекции импортных стандартов-аналогов для проведения сравнительных исследований и др.

Создание ГСО КВ обеспечит научно-технический и методический задел для разработки и внедрения технологий производства сильнодействующих фармсубстанций в РФ.

Следует отметить, что, по оценкам специалистов российских и международных организаций, реальный объем доступных анальгетиков любого производства, используемых для купирования сильной и средней боли у пациентов, покрывает в РФ менее 10% потребности только для паллиативной анальгезии больных [27–32], без учета потребностей других категорий пациентов, требующих обезболивания. Поэтому в РФ необходимо увеличить производство анальгетиков (как фармсубстанций, так и фармпрепаратов) в целом более чем в 10 раз в единицах MED с учетом потребности отечественной медицины в конкретных анальгетиках и их эффективных лекарственных формах, удобных для пациентов и медицинского персонала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка, производство и оценка качества фармсубстанций и готовых форм на основе сильнодействующих веществ предъявляет ряд специфических требований к оборудованию, стандартам, методическому обеспечению и т.д. Наличие государственных стандартных образцов состава контролируемых сильнодействующих компонентов анальгетиков является законодательно необходимым условием обеспечения производства и контроля качества как отечественных, так и зарубежных фармпрепаратов, используемых в РФ. Отсутствие ГСО КВ не позволяет проводить количественный инструментальный анализ, что является сдерживающим фактором для отечественного фармпроизводства в условиях острой необходимости увеличения производства сильнодействующих анальгетиков более чем в 10 раз в единицах MED. Отсутствие данных ГСО также не позволяет проводить количественные, юридически значимые экспертно-криминалистические инструментальные анализы в области наркотических и психотропных средств.

Предлагаемый подход заключается в двухэтапной (первая очередь – до 15 ГСО, вторая очередь – до 100 ГСО) разработке и организации производства наиболее актуальных ГСО состава КВ на выделенном объекте, на котором уже функционирует производство ГСО ТХ. Процесс разработки и производства предлагаемых ГСО КВ также будет способствовать разработке технологий производства отечественных фамсубстанций на основе наиболее востребованных медициной сильнодействующих анальгетиков и анестетиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. Сетевая БД Росстандарта «Сведения об утвержденных типах стандартных образцов». URL: http://www.fundmetrology.ru/09_st_obr/2list.aspx (дата обращения 14.01.2016).
2. Федеральный закон «Об обеспечении единства измерений» (с изменениями на 13 июля 2015 года). URL: http://docs.cntd.ru/document/902107146 (дата обращения 14.01.2016).
3. Федеральный закон РФ от 31 декабря 2014 г. № 488-ФЗ «О промышленной политике в Российской Федерации» URL: http://www.rg.ru/2015/01/12/promyshlennost-dok.html (дата обращения 14.01.2016).
4. Приказ Минпромторга РФ от 17.06.2009 № 529 «Об утверждении Стратегии обеспечения единства измерений в России до 2015 года» URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99109/ (дата обращения 14.01.2016).
5. Единый перечень измерений, относящихся к сфере государственного регулирования. URL: chttp://www.fundmetrology.ru/07_epi/epi.pdf (дата обращения 14.01.2016).
6. Е.В. Осинцева. Тенденции и перспективы развития номенклатуры СО в РФ // Материалы II-й Международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Екатеринбург. 2015.
7. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожении. URL: http://www.un.org/disarmament/WMD/Chemical/pdf/cwctext-russian.pdf (дата обращения 14.01.2016).
8. Постановление Правительства РФ от 30 июня 1998 г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ, их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями); Постановление от 27 февраля 2015 года № 174 «О включении новых психотропных соединений в перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров». URL: http://fskn.gov.ru/pages/main/info/official_information/7947/index.shtml (дата обращения 14.01.2016).
9. Федеральный закон РФ от 3 февраля 2015 г. № 7-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации». URL: http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201502040043?index=0&rangeSize=1&back=False (дата обращения 14.01.2016).

10. Статья 234.1 УК РФ. Незаконный оборот новых потенциально опасных психоактивных веществ. URL: http://ppt.ru/kodeks.phtml?kodeks=20&paper=234.1 (дата обращения 14.01.2016).
11. WADA Prohibited List. URL: https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list (дата обращения 14.01.2016).
12. International Standard for Testing and Investigations (ISTI). URL: https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/international-standard-for-testing-and-investigations-isti-0 (дата обращения 14.01.2016).
13. D.G. Barceloux. Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants. – UK: Wiley, 2012. 1064 p.
14. A. Dasgupta. Handbook of Drug Monitoring Methods: Therapeutics and Drugs of Abuse. – USA: Humana Press, 2008. 444 p.
15. А.В. Соснов, Б.С. Пункевич, С.В. Садовников, Ф.М. Семченко. Разработка и выпуск стандартных образцов контролируемых биологически активных веществ ограниченного использования // Материалы II-й Международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Екатеринбург, 2015.
16. US Department of Justice. Controlled substances. Alphabetical order. URL: http://www.deadiversion.usdoj.gov/schedules/orangebook/c_cs_alpha.pdf (дата обращения 14.01.2016).
17. Е.В. Осинцева, С.В. Медведевских. ГССО РФ // Стандартные образцы. 2015. № 2. С. 4–30.
18. ГОСТ ISO Guide 31–2014. Стандартные образцы. Содержание сертификатов (паспортов) и этикеток. – М.: Стандартинформ, 2015. 16 с.
19. D.G. Harris. Management of pain in advanced disease // British Medical Bulletin. 2014. V. 110(1). С. 117–128.
20. В. А. Семенченя, О. М. Конопацкова, Е. А. Валах. Некоторые аспекты медикаментозного лечения хронической боли онкологического генеза: Методические рекомендации для врачей. – Саратов, 2014.
21. Equianalgesic. Wikipedia. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Equianalgesic (дата обращения 14.01.2016).
22. A.E. Patanwala, J. Duby, D. Waters, B.L. Erstad. Opioid conversions in acute care // Ann Pharmacother. 2007. № 41(2). С. 255-266.
23. A.M. Trescot, S. Helm, H. Hansen, R. Benyamin, S.E. Glaser, R. Adlaka, S. Patel, L. Manchikanti. Opioids in the management of chronic non-cancer pain: an update of American Society of the Interventional Pain Physicians (ASIPP) Guidelines // Pain Physician. 2008. V. 11(2). P. S5-S62.
24. Распоряжение Правительства РФ от 26 декабря 2015 г. № 2724-р. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2016 г.
25. Н.Н. Савва и др. Фармакотерапия персистирующей боли у детей и подростков при оказании паллиативной помощи в стационарных и амбулаторно-поликлинических условиях. Клинические рекомендации. МЦППД ГУЗ НПЦ департамента здравоохранения г. Москвы. 2014. 23 с.
26. А.Д. Каприн и др. Фармакотерапия хронического болевого синдрома у взрослых пациентов при оказании паллиативной медицинской помощи в стационарных и амбулаторно-поликлинических условиях: Методические рекомендации ФМИЦ им. П.А. Герцена МЗ РФ. – М. 2015.
27. А.Д. Каприн, Г.Р. Абузарова. Фармакотерапия онкологической боли в России. Реальность и перспективы: Доклад ФГБУ МНИОИ им. П.А.Герцена // Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы паллиативной медицинской помощи. особенности оказания противоболевой терапии». – М. 2014.
28. О.И. Усиенко. Проблемы доступности наркотических анальгетиков для лечения хронического болевого синдрома у инкурабельных онкологических больных. 2010. URL: http://www.pallcare.ru/ru/?p=news&id=1265443043 (дата обращения 16.01.2016).
29. Т. Бескаравайная. Наркотические анальгетики в России получают не более 7-8% нуждающихся // Медицинский вестник. 17 июня 2015. URL: http://www.medvestnik.ru/content/Narkoticheskie-analgetiki-v-Rossii-poluchaut-ne-bolee-7-8-nujdaushihsya.html (дата обращения 16.01.2016).
30. А.В. Палехов. Нормативно-правовая база адекватной опиоидной терапии в России и её реализация в субъектах РФ // Материалы Международного медицинского конгресса «Паллиативная медицина в здравоохранении Российской Федерации и стран СНГ». – М. 2015. URL: http://www.palliamed.ru/news/news_443.html (дата обращения 16.01.2016).
31. Г.Р. Абузарова. Доступность опиоидных анальгетиков в России. Что изменилось в 2015 г.? // Материалы Международного медицинского конгресса «Паллиативная медицина в здравоохранении Российской Федерации и стран СНГ». – М. 2015. URL: http://www.palliamed.ru/news/news_443.html (дата обращения 16.01.2016).
32. S.R. Connor, M.C. Sepulveda Bermedo. Global Atlas of Palliative Care at the End of Life. WHO/ Worldwide Palliative Care Alliance (WPCA). 2014.

УДК 615.45, 658.562

1 – Национальный фармацевтический университет, 61168, Украина, г. Харьков, ул. Валентиновская, 4

2 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик», 109044, Россия, г. Москва, Лавров переулок, 6

1 – National Pharmaceutical University, 4, Valentinovskaya str., Kharkov, 61168, Ukraine

2 – Federal Budget Institution «State Institute of Drugs and Good Practices», 6, Lavrov per., Moscow, 109044, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: shestakov@gilsinp.ru

РИСК-АНАЛИЗ НЕСООТВЕТСТВИЙ, ВЫЯВЛЯЕМЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ GMP-ИНСПЕКЦИЙ

Ю.В. Подпружников[1], В.Н. Шестаков[2]*

Резюме. Проведен обзор информации о результатах GMP-инспектирования и основных выявляемых несоответствиях. Установлено, что в сфере инспектирования фармпредприятий остаются нерешенные проблемы с интерпретацией выявленных несоответствий, т.е. с объективным (унифицированным, стандартизованным) присвоением этим несоответствиям того или иного уровня критичности, что, в свою очередь, влияет на регуляторные решения. Указанные проблемы актуальны не только для GMP-инспекций стран ближнего зарубежья, но и для других инспекций (как входящих в PIC/S, так и не входящих в эту организацию). Предложено создание унифицированной процедуры присвоения уровня критичности с последующей доработкой этого документа и его апробацией в международном масштабе. Для обработки, ранжирования и обобщения результатов инспектирования авторами впервые использован анализ Парето. Результаты такого анализа позволяют расставить правильные приоритеты при планировании и проведении GMP-инспекций, а для предприятий – рационально использовать ресурсы для устранения причин доминирующих проблем (критических несоответствий). Показано, что методология ранжирования выявленных несоответствий с первоначальной разбивкой их на определенные категории и с последующей группировкой в отдельные блоки перспективна, но нуждается в дальнейшем развитии и усовершенствовании.

Ключевые слова: надлежащая производственная практика, инспектирование производств, несоответствия, риск-анализ.

RISK ANALYSIS OF THE DEFICIENCIES FOUND BY THE GMP INSPECTIONS

Yu.V. Podpruznikov[1], V.N. Shestakov[2]*

Abstract. A review of GMP-inspections results and the main found deficiencies was carried out. It was established that in the field of inspection of pharmaceutical companies the unresolved problems with the interpretation of the revealed deficiencies are still, i.e. with the objective (a unified, standardized) assigned to these inconsistencies to a criticality levels, which, in turn, affect the regulatory decisions. These problems are current not only to GMP inspections for Commonwealth of Independent States, but also to other inspections (included and not included to PIC/S). The unified procedure of assigning levels of severity with the subsequent completion of the document and its approbation on an international scale was proposed. For processing, ranking and summarize the results of the inspections we used the Pareto analysis for the first time. The results of this analysis allow place right priorities in planning and conducting of GMP-inspections, and for the enterprises – for rational use of the resources to address the causes, to get rid of the dominant issues (critical deficiencies). It was shown that the methodology for ranking of the identified deficiencies with the primary breakdown to the certain categories and followed by their grouping into separate blocks is perspective but needs to be developed and improved in future.

Keywords: good manufacturing practices, inspection facilities, deficiencies, risk analysis.

ВВЕДЕНИЕ

Инспектирование является ключевым элементом в процессе оценки соответствия предприятий требованиям надлежащей производственной практики (GMP). Практически любая инспекция предприятия-производителя лекарственных средств (ЛС) выявляет те или иные несоответствия/нарушения требований GMP, которые отражаются в отчете об инспектировании и являются основой для дальнейших регуляторных действий (решения о выдаче сертификата GMP или об отказе в его выдаче, распоряжении об устранении несоответствий/нарушений, приостановлении или аннулировании лицензии, запрещении производства и проч.). В практике инспекторатов GMP в регуляторных органах стран-членов ЕС, а также органов, которые входят в международную систему сотрудничества фармацевтических инспекций (PIC/S), принято все обнаруженные несоответствия требованиям GMP делить на три уровня по степени их значимости (т.е. «тяжести»): «критические», «существенные» и «прочие» [1, 2]. Аналогичная градация выявляемых несоответствий рекомендована ВОЗ [3], такой же подход к классификации несоответствий предполагается использовать в рамках общего рынка ЛС государств-членов ЕАЭС [4].

Под критическим несоответствием понимается несоответствие, которое вызывает или приводит к существенному риску производства ЛС, опасного для здоровья и жизни человека. Наличие в отче-

те об инспектировании хотя бы одного критического несоответствия обычно влечет за собой вывод о несоответствии GMP производственного участка либо предприятия в целом (если данное несоответствие касается всего предприятия).

Существенное несоответствие – это некритическое несоответствие, которое:

– привело или может привести к производству ЛС, не соответствующего документам регистрационного досье данного ЛС;

– указывает на существенное отклонение от правил GMP;

– указывает на существенное отклонение от требований иных нормативных правовых актов в сфере обращения ЛС;

– указывает на неспособность производителя ЛС осуществлять серийный выпуск ЛС однородного качества или неспособность уполномоченного лица организации-производителя выполнять свои должностные обязанности;

– является комбинацией несоответствий, ни одно из которых само по себе не является существенным, но которые в совокупности представляют существенное несоответствие и должны объясняться и фиксироваться в качестве такового.

Наименее опасное, «прочее», несоответствие – это несоответствие, которое не может классифицироваться как критическое или существенное, но указывает на отклонение от установленных правил GMP [1, 2, 4].

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ВЫЯВЛЕННЫХ НЕСООТВЕТСТВИЙ

В связи с большой значимостью уровней критичности обнаруживаемых несоответствий очень важна унификация методологии, которая применяется при классификации несоответствий, а также при отнесении тех или иных нарушений к конкретному уровню критичности. К сожалению, в сфере GMP-инспектирования остаются нерешенные проблемы с интерпретацией выявленных несоответствий, т.е. с объективным (унифицированным, стандартизованным) присвоением этим несоответствиям того или иного уровня критичности, что, в свою очередь, влияет на регуляторные решения. Указанные проблемы актуальны не только для GMP-инспекций стран ближнего зарубежья, но и для других инспекций (как входящих в PIC/S, так и не входящих в эту глобальную организацию). Известен лишь один документ, стандартизующий присвоение того или иного уровня критичности типичным несоответствиям GMP, которые выявляются в процессе инспекции фармпроизводства [5]. Этот документ разработан и используется GMP-инспекторатом Канады и по своему статусу является внутриинспекционной стандартной операционной процедурой (СОП). При всей полезности этого документа отметим, что он не лишен недостатков: так, в ряде пунктов СОПа предусмотрена возможность повышения уровня критичности, что увеличивает субъективизм оценки. Кроме того, добавляется новая составляющая оценки – критичность самих выпускаемых ЛС, которая, в свою очередь, состоит из трех уровней и добавляет элемент неопределенности в присвоение уровня критичности обнаруженных нарушений. Для выработки унифицированных подходов к интерпретации несоответствий GMP и стандартизации присвоения уровня их критичности в 2013 году в рамках PIC/S была создана специальная рабочая группа из представителей регуляторных органов разных стран [6]. Задача рабочей группы – выработать подходы к решению указанной проблемы, которая на сегодняшний день остается нерешенной.

Второй, не менее важной проблемой в сфере подтверждения соответствия требованиям GMP является проведение анализа и обобщения выявленных несоответствий требованиям GMP. При этом есть смысл анализировать количество как несоответствий, разбитых на уровни критичности, так и общее количество выявленных нарушений. Как показывает анализ профильной литературы, для рациональной статистической обработки выявленных несоответствий есть смысл руководствоваться не отдельными пунктами, главами или приложениями GMP, а разбить все недостатки на отдельные категории с дальнейшей возможностью их группировки в соответствующие блоки. Второй путь предпочтительнее, поскольку то или иное требование GMP зачастую входит в несколько пунктов, глав и приложений GMP, что затрудняет статистическую обработку и выявление закономерностей в результатах инспекций.

Известен ряд публикаций с количественной характеристикой нарушений, выявленных в процессе инспектирования предприятий-производителей ЛС различными регуляторными органами. В публикации [7] приводится статистика основных несоответствий, выявленных Европейским агентством по оценке медикаментов (в настоящее время оно называется Европейским медицинским агентством – EMA) в процессе инспектирования предприятий в период 1995–2005 гг. В этой публикации все возможные GMP-несоответствия разбиты на 40 категорий, приводится также процент выявленных несоответствий каждого уровня критичности по каждой из категорий. EMA указывает, что сама методология разбивки на категории была разработана MHRA – регуляторным Агентством по медикаментам и продукции здравоохранения Великобританиии. Примерно такой же подход был использован для анализа несоответствий, выявлен-

ных EMA при инспектировании производителей ЛС в 2006 году [8]. Некоторые статистические данные по проведенным GMP-инспекциям публикуются в Украине, но в отношении данных, которые можно использовать для дальнейшего анализа, представляет интерес лишь публикация [9].

Регулярные отчеты с анализом выявленных GMP-несоответствий публикует MHRA [10–12]. Следует отметить, что именно агентство Великобритании зачастую является создателем нормативной и методической базы GMP на европейском континенте и в масштабах всех регуляторных органов-членов PIC/S. Это и неудивительно, учитывая как то, что именно с Великобритании началось внедрение GMP в Европе, так и то, что текст этих европейских правил в виде «Оранжевой книги» также впервые был издан в Великобритании [13]. В отчетах MHRA о выявленных нарушениях в сфере GMP все несоответствия разбиты на 66 категорий, которые, в свою очередь, объединены в 8 групп. Проводится анализ как наиболее часто выявляемых критических несоответствий в разрезе установленных категорий, так и анализ общего числа выявляемых несоответствий.

В 2011 году в Кейптауне (ЮАР) состоялся семинар PIC/S, посвященный надлежащей практике фармацевтических инспекторатов. Перед проведением семинара всем членам и наблюдателям PIC/S был разослан опросник с целью проведения глобального анализа несоответствий, выявляемых GMP-инспекциями. По результатам полученных ответов все данные были обработаны, обобщены и опубликованы авторами в [14]. В публикации отмечается, что при проведении анализа была использована разработанная MHRA разбивка всех несоответствий на категории и группы.

Как видно из приведенной выше информации, проблема обобщения и анализа данных о выявленных в процессе GMP-инспектирования несоответствиях является актуальной. Такой анализ может служить основой для планирования инспекторских действий, установления приоритетов в GMP-инспектировании, материалы такого анализа целесообразно использовать для обучения инспекторов и усовершенствования их навыков. С точки зрения промышленности такой анализ дает возможность усовершенствовать фармацевтическую систему качества на предприятии, сосредоточить усилия предприятия на устранении наиболее значимых несоответствий, улучшить степень соответствия требованиям GMP и таким образом в конечном итоге увеличить безопасность пациента.

Наиболее эффективным и современным методом, используемым для анализа, установления тенденций и обобщения выявляемых несоответствий требованиям GMP, является риск-анализ; подобного до настоящего времени сделано не было. Настоящая публикация посвящена проведению риск-анализа выявляемых несоответствий в сфере GMP, что, учитывая вышеизложенное, несомненно является актуальным.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходя из целей настоящей работы, объектами наших исследований были несоответствия, которые выявляются в процессе GMP-инспекций предприятий-производителей ЛС. При этом использовались данные из открытых источников о результатах инспекций, проведенных GMP-инспекторатами EMA, MHRA, Гослекслужбы Украины и других регуляторных органов, входящих в PIC/S. В качестве методов были использованы структурно-логический метод и основные методы описательной статистики (анализ Парето). Для проведения вычислений, дальнейшего анализа и представления его результатов была использована программа Excel®.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрим описанные в [7] несоответствия, выявленные EMA в результате проведения 435 инспекций за десятилетний период (1995-2005). В ходе инспекций было выявлено 9465 несоответствий, из них критических – 193 (2%), существенных – 989 (10%) и прочих – 8283 (88% от общего числа несоответствий). Как было указано выше, наибольший интерес представляет анализ именно критических несоответствий (таблица 1) и их распределение по различным категориям. Применим к данным несоответствиям анализ Парето, т.е. рассчитаем, какие критические несоответствия дают наибольший вклад в общее количество нарушений, т.е. являются наиболее значимыми. Для этого определим, какие из нарушений дают кумулятивный процент, превышающий 80% (именно эта цифра является граничной в соответствии с классическим вариантом анализа Парето [15]). Как видно из расчетов, наиболее проблемными (их кумулятивный процент составляет более 80%) являются первые 12 категорий в сфере GMP, приведенные в таблице: конструкция и обслуживание помещений; потенциальная микробная, а также физическая/химическая контаминация; документация, описывающая процедуры и элементы системы качества; валидация процессов и проведение их в надлежащих условиях; соблюдение гигиенических требований, требований к технологической одежде и обучение персонала; контроль и мониторинг внутрипроизводственной среды; обеспечение стерильности, а также конструкция и обслуживание оборудования. Исходя из концепции Парето, причин этих несоответствий всего около 20%, и если направить свои усилия на устранение именно этих причин, то эффективность такой работы будет очень высокой и предприятия смогут избавиться от 80% указанных ниже проблем (критических несоответствий).

Таблица 1.

Критические несоответствия, выявленные EMEA в процессе 435 GMP-инспекций в 1995–2005 гг.

№	Категория несоответствия GMP	Кол-во	Отн. %	Кумулятивный %
1	Конструкция и обслуживание помещений	31	16,1	16,1
2	Потенциальная микробная контаминация	20	10,4	26,5
3	Потенциальная химическая/физическая контаминация	17	8,8	35,3
4	Документация – элементы системы качества/процедуры	16	8,3	43,6
5	Валидация процессов	12	6,2	49,8
6	Организация работ – чистота, опрятность	12	6,2	56,0
7	Персонал – гигиена, одежда	11	5,7	61,7
8	Контроль окружающей среды	10	5,2	66,9
9	Персонал – обучение	8	4,1	71,0
10	Обеспечение стерильности	8	4,1	75,1
11	Мониторинг окружающей среды	7	3,6	78,7
12	Конструкция и обслуживание оборудования	6	3,1	81,8
13	Процедура выпуска серии в реализацию	5	2,6	84,4
14	Документация – спецификации и испытания	5	2,6	87,0
15	Документация – производство	4	2,1	89,1
16	Маркировка статуса помещений и оборудования в процессе эксплуатации	4	2,1	91,2
17	Обработка и контроль упаковочных материалов	3	1,6	92,8
18	Внутрипроизводственный контроль – контроль и мониторинг производственных операций	3	1,6	94,5
19–26	Другие (в сумме)	11	5,5	100,0
	Всего	193	100	

Проанализируем теперь статистику несоответствий, выявленных инспекциями, проведенными украинским GMP-инспекторатом. В таблице 2 представлены критические несоответствия, выявленные в процессе инспектирования зарубежных предприятий в течение 2009 года. В течение указанного периода было проведено 45 выездных инспекций (соавтор данной публикации в то время курировал работу украинских GMP-инспекторов, проверявших зарубежные предприятия, и сам лично участвовал в таких проверках). Всего было обнаружено 167 критических несоответствий, что составило в среднем 3,7 критических несоответствий на 1 инспекцию.

На рисунке 1 представлена диаграмма Парето, из которой ясно видно, что первые семь категорий GMP дают кумулятивный процент несоответствий, превышающий 80 %.

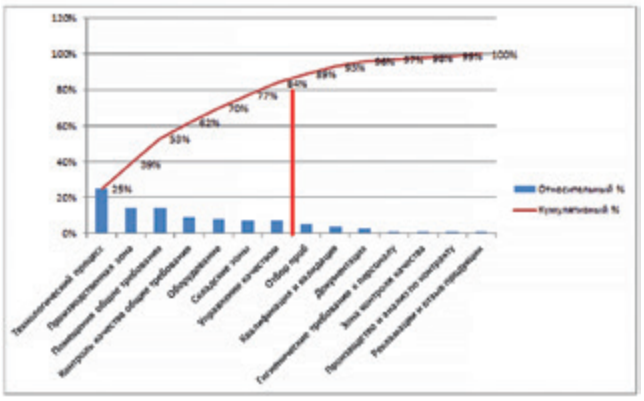


Рисунок 1. Диаграмма Парето критических несоответствий, выявленных украинским GMP-инспекторатом при сертификации зарубежных предприятий в 2009 году

Представляет интерес также анализ критических несоответствий, выявленных украинским GMP-инспекторатом в ходе проверок отечественных предприятий в течение 2011 года. За этот период было проведено 80 плановых проверок украинских предприятий-производителей ЛС. Всего было обнаружено 274 критических несоответствия (около 16% от всех нарушений), что составляет в среднем 3,4 критических несоответствий на 1 инспекцию.

На рисунке 2 представлена диаграмма Парето, из которой видно, что наибольший вклад (более 80%) составляют несоответствия помещений в целом (конструкция, обслуживание), а также производственных помещений; системы управления качеством; проведения квалификации и валидации; несоблюдение требований к персоналу (включая гигиенические требования), к контролю качества и к конструкции, а также к обслуживанию оборудования

Таблица 2.

Критические несоответствия, выявленные украинским инспекторатом в процессе 45 GMP-инспекций зарубежных производителей в 2009 г.

№	Критическое несоответствие GMP	Кол-во	Отн. %	Кумулятивный %
1	Технологический процесс	41	25	25
2	Производственная зона	24	14	39
3	Помещения – общие требования	23	14	53
4	Контроль качества – общие требования	15	9	62
5	Оборудование	13	8	70
6	Складские зоны	11	7	77
7	Управление качеством	11	7	84
8	Отбор проб	9	5	89
9	Квалификация и валидация	7	4	93
10	Документация	5	3	96
11	Гигиенические требования к персоналу	3	1	97
12	Зона контроля качества	2	1	98
13	Производство и анализ по контракту	2	1	99
14	Рекламации и отзыв продукции	1	1	100
	Всего	167	100	

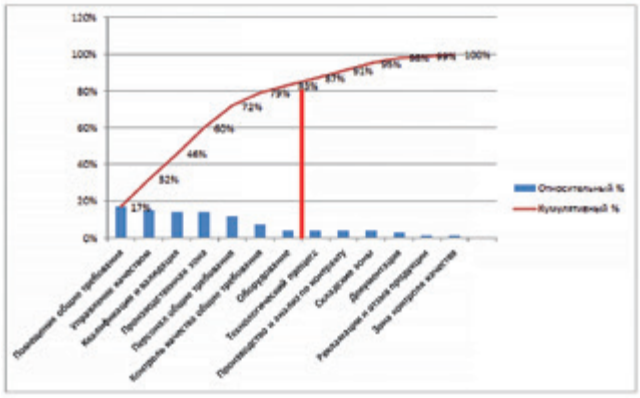


Рисунок 2. Диаграмма Парето критических несоответствий, выявленных украинским GMP-инспекторатом при плановом инспектировании отечественных производителей в течение 2011 года

Сопоставление наиболее значимых несоответствий, выявленных украинским инспекторатом при инспектировании отечественных и зарубежных производственных площадок, показало, что 5 из 7 категорий в обоих случаях совпадают, а 2 оставшиеся категории близки друг к другу по их процентному вкладу. Количество критических несоответствий, приходящихся на одну инспекцию, также близко друг к другу (3,4 и 3,7), что говорит о примерно одинаковом (не очень высоком) среднем уровне системы качества и типичных нарушениях GMP. Результатом выявленных нарушений стали соответствующие регуляторные действия: более 50% зарубежных производителей было отказано в выдаче сертификата GMP по причине их несоответствия указанным требованиям (процент соответствующих требованиям GMP зарубежных предприятий в период с 2009 по 2014 год ни разу не превышал 50%). По результатам инспектирования в 2011 году было аннулировано 37 лицензий на производство ЛС в Украине, что никак не отразилось негативно на рынке ЛС, их ассортименте и доступности в Украине [16].

Если с результатами инспектирования украинского GMP-инспектората сравнить статистику несоответствий, выявляемых инспекциями EMA, то можно увидеть как совпадающие категории, так и довольно существенные различия в основных «проблемных» категориях. Так, в категориях несоответствий, выявленных украинским GMP-инспекторатом, отсутствуют такие, как потенциальная микробная, физическая/химическая контаминация; обучение персонала; контроль и мониторинг внутрипроизводственной среды. Возможно, это связано с различной системой разбивки несоответствий на различные категории: EMA использовало 40 категорий, а украинский инспекторат разделял все нарушения на 20 категорий. Важным различием является среднее количество выявляемых критических несоответствий, которые прихо-

дятся на одну инспекцию. По результатам инспекций EMA это количество составило менее 0,5 несоответствия на 1 инспекцию, в то время как украинский GMP-инспекторат выявлял почти в 10 раз больше (3,4–3,7 критических нарушений на одну инспекцию). Это может быть связано с двумя причинами:

- степень соответствия требованиям GMP на предприятиях, которые инспектировались EMA, был значительно выше, т.к. инспектирование проводилось в рамках регистрации ЛС по централизованной процедуре (т.е. в основном оригинальных ЛС, предполагающих высокий уровень организации производства);
- интерпретация и присвоение уровня «критическое» выявленному несоответствию в GMP-инспекторатах EMA и Украины существенно различается.

Частично вторая из указанных причин была охарактеризована выше, где отмечалось, что проблема унификации и стандартизации в присвоении уровня критичности типичным GMP-несоответствий требует своего решения. Одним из возможных вариантов решения проблемы является разработка и апробация в пилотном режиме проекта процедуры присвоения уровней критичности тем или иным несоответствиям, затем доработка этого документа и его апробация в расширенном (возможно – международном) масштабе. Гармонизации и выработке единых подходов будут содействовать постоянные курсы по обучению инспекторов, совещания GMP-инспекторатов разных стран, постоянный обмен информацией о результатах инспектирования и проч.

Как отмечалось выше, методологическую основу для статистической обработки путем ранжирования выявленных несоответствий разработало регуляторное агентство Великобритании. Эта система заключается в выделении 66 категорий в рамках правил GMP, которые, в свою очередь, объединены в 8 групп:

– управление качеством;

– производство;

– управление материалами;

– помещение и оборудование;

– контроль качества;

– валидация;

– соответствие регуляторным требованиям;

– персонал.

MHRA достаточно часто публикует анализ выявленных несоответствий, последний из них посвящен анализу результатов GMP-инспекций за 2013 год [12]. В обзоре, кроме выделения наиболее часто встречающихся 10 критических и существенных несоответствий, охарактеризовано каждое из них и проанализирована динамика изменения их количества за последние 5 лет. Интересными представляются данные о среднем количестве критических несоответствий на одну GMP-инспекцию MHRA, которое в 2013 г. составляло 29/630=0,046 несоответствий на одну инспекцию. Таким образом, в среднем лишь одно критическое несоответствие выявляется при проведении 21 инспекции! Сопоставить категории критических несоответствий с вышеописанными результатами, полученными GMP-инспекторатами EMA и Украины, достаточно проблематично. Трудности связаны с тем, что отчеты MHRA не содержат отдельных данных о критических и существенных несоответствиях, а содержат лишь суммарные (обобщенные) данные. В соответствии с указанным отчетом наиболее распространенные несоответствия критического и существенного уровня связаны с системой расследования отклонений, управлением качеством, корректирующими и предупреждающими мерами, потенциальной химической/физической контаминацией, аудитом поставщиков и подрядчиков, контроль изменений и проч. Как видно из перечисленных несоответствий, они в значительной степени отличаются от тех, которые приведены в таблицах 1, 2 и на рисунке 2.

Методология MHRA для ранжирования выявленных несоответствий была использована для анализа информации GMP-инспекторатов, входящих в PIC/S [14]. Обобщение информации о наиболее опасных несоответствиях (критического и существенного уровня) дает следующую последовательность категорий GMP, в которых данные нарушения были выявлены: конструкция и обслуживание помещений; потенциальная контаминация (физическая, химическая, микробиологическая), конструкция и обслуживание оборудования, обеспечение стерильности; процедура выпуска серий в реализацию, валидация процессов и проч. Как можно видеть, указанные категории во многом совпадают с теми, в которых выявлялись критические отклонения инспекторатами EMA (таблица 1) и Украины (таблица 2, рисунок 2). В указанном анализе был использован еще один рациональный прием: сначала все несоответствия разделялись на категории, а затем категории объединялись в группы, и последние уже сравнивались друг с другом. Такой прием дает возможность обработать большие массивы разнородной информации (разного рода несоответствия требованиям GMP), однако есть смысл его усовершенствовать, применив процедуры статистической обработки данных, например регрессионный анализ, т.е. рассчитать коэффициенты корреляции при сравнении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе анализа результатов инспекций, проведенных разными GMP-инспекторатами, показано, что существует проблема унификации и стандартизации в присвоении уровня критичности типичным GMP-несоответствиям. Возможный путь решения указанной проблемы – создание унифицированной процедуры, затем доработка этого документа и его апробация в международном масштабе. Гармонизации и выработке единых подходов будут содействовать также постоянные курсы по обучению инспекторов, совещания GMP-инспекторатов разных стран и постоянный обмен информацией о результатах инспектирования.

Нами впервые продемонстрирована целесообразность использования инструментов управления рисками (анализ Парето) для оценки и анализа несоответствий требованиям GMP, выявляемых в процессе инспектирования фармацевтических производств.

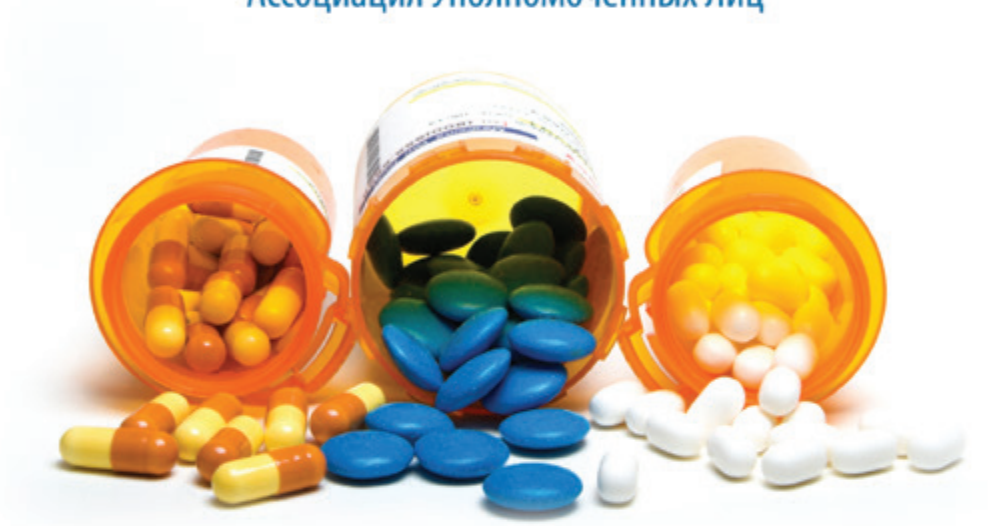
Показано, что методология ранжирования выявленных несоответствий с разбивкой их на категории с последующей группировкой в отдельные блоки перспективна, но нуждается в дальнейшем развитии и усовершенствовании. Перспективным является применение более мощных статистических инструментов для обработки указанных массивов данных о несоответствиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. EMA/572454/2014 Rev.17. GMP Inspection Report – Union Format. P.175-178. URL: http://www.ema.europa.eu/ (дата обращения 25.01.2015).
2. PI 013-3. Standard operating procedure PIC/S Inspection Report format. Annex 1. PIC/S 25 September 2007. URL: http://www.picscheme.org/ (дата обращения 25.01.2015).
3. Guidance on Good Manufacturing Practices (GMP): inspection report // WHO Technical Report Series. 2003. № 908. Annex 6. URL: http://www.who.int (дата обращения 25.01.2015).
4. Правила проведения фармацевтических инспекций (проект в ред. от 29.05.2015). Приложение к решению Совета Евразийской экономической комиссии. URL: http://www.eurasiancommission.org/ (дата обращения 25.01.2015).
5. Risk Classification of Good Manufacturing Practices (GMP) Observations GUI-0023 Health Canada. Health Products and Food Branch Inspectorate. URL: http://www.hc-sc.gc.ca/ (дата обращения 25.01.2015).
6. Press release PIC/S meetings Geneva, Switzerland. 17 June 2013. URL: http://www.picscheme.org/ (дата обращения 25.01.2015).
7. EMEA/INS/GMP/23022/2007 Good Manufacturing Practice: An analysis of regulatory inspection findings in the centralised procedure. European Medicines Agency Inspections. URL: http://www.ema.europa.eu/ (дата обращения 25.01.2015).
8. EMEA/INS/GMP/594072/2007 Good Manufacturing Practice: An analysis of regulatory inspection findings in the centralised procedure. European Medicines Agency Inspections. URL: http://www.ema.europa.eu/ (дата обращения 25.01.2015).
9. Н.А. Тахтаулова. Организация валидационной деятельности на фармацевтическом предприятии: автореферат. дис. … к.фарм.н. – Харьков. 2013. 24 с.
10. Di Morris Deficiency Data Review April 2010 to March 2011. August 2011. MHRA. URL: https://www.gov.uk/ (дата обращения 25.01.2015).
11. Di Morris Deficiency Data Review April 2011 to March 2012. April 2012. MHRA. URL: https://www.gov.uk/ (дата обращения 25.01.2015).
12. GMP Inspection Deficiencies 2013. Review of Deficiencies Observed in 2013. Regulating medicines and medical devices. MHRA. URL: https://www.gov.uk/ (дата обращения 25.01.2015).
13. Ю.В. Подпружников, А.А. Ишмухаметов, А.С. Немченко и др. Хрестоматия фармацевтического качества / Под ред. А.А.Ишмухаметова. – М.: ООО «Группа РЕМЕДИУМ», 2015. 432 с.
14. H. Smallenbroek, B. Meow Hoe. Inside PIC/S: Top GMP Deficiencies // Pharm. Technol. 2012. № 36(4). P. 1–3.
15. В.В. Ефимов, Т.В. Барт. Статистические методы в управлении качеством продукции. – М.: КНОРУС, 2006. 172 с.
16. Ю.В. Подпружников. Переход на GMP и вступление в ВТО – ad exemplum // Ремедиум. 2012. № 5. P. 41–45.

МФАУЛ

Международная Фармацевтическая Ассоциация Уполномоченных Лиц



Седьмая фармацевтическая неделя качества

Обеспечение качества лекарственных средств

2016

14-17 июня, Минск, Беларусь

www.pharm-quality.org

www.qp-association.ru

Партнер:

ВИАЛЕК

Информационная поддержка:

Pharm-Med
Работа в фармацевтике и медицине

Чистые Помещения и технологические среды

Фармацевтическая отрасль

Разработка и регистрация лекарственных средств

Фармацевтическая промышленность

Новости GMP

Pharmika
поиск & каталог

УДК 614.27, 615.11

1 – ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

1 – 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: nadya.kartashova@pharminnotech.com

УСТАНОВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПИСАНИЯ ОБЪЕКТА ГОСУДАРСТВЕННОЙ ЗАКУПКИ «ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ» КАК НЕОБХОДИМОЕ УСЛОВИЕ ПРЕДОСТАВЛЕНИЯ ПРЕФЕРЕНЦИЙ ЛОКАЛЬНЫМ ПРОИЗВОДИТЕЛЯМ

И.А. Наркевич[1], З.М. Голант[1], Н.С. Карташова[1]*

Резюме. Данная статья посвящена анализу нормативного пространства и практики государственных закупок лекарственных средств. Авторами установлено, что существуют противоречия в реализации нормативных требований к организации государственных закупок. Обосновывается необходимость установления особенностей описания объекта государственной закупки «лекарственный препарат» для предоставления преференций локальным производителям лекарственных средств при государственных закупках. Предлагается реализовать право Правительства Российской Федерации на установление особенностей описания отдельных видов объектов закупок (часть 5 статьи 33 Федерального закона «О контрактной системе»).

Ключевые слова: фармацевтический рынок, лекарственные препараты, государственные закупки, преференции, локализация производства лекарственных средств.

ESTABLISHMENT OF FEATURES DESCRIPTION OF OBJECT GOVERNMENT PROCUREMENT «MEDICINAL PRODUCTS» AS A CONDITION OF GRANTING PREFERENCES TO LOCAL PRODUCERS

I.A. Narkevitch[1], Z.M. Golant[1], N.S. Kartashova[1]*

Abstract. The article treats and summarizes the knowledge on the regulatory framework and the government procurements practice of medicinal products. The authors established that there are inconsistencies of the implementation of the regulatory requirements for the organization of government procurements. The necessity of distinctive features of medicinal products as the objectives of government procurement preferences for local manufacturers of medicinal products has been established. It is proposed to exercise a right of the Government of the Russian Federation in the setting of distinctive features of the specific objectives of government procurements (Part 5 of Article 33 of the Federal Law «On the contract system»).

Keywords: pharmaceutical market, medicinal products, government procurement, preferences, localization of drug production.

ВВЕДЕНИЕ

Специфика сферы государственных закупок лекарственных препаратов характеризуется, с одной стороны, фактором особенности товара, который в данном случае является предметом закупок, с другой стороны – фактором значительной доли публичных средств на фармацевтическом рынке [1–4]. По различным оценкам, она составляет от 30 до 35% [5]. Это обстоятельство обуславливает активную конкуренцию между фармпроизводителями за государство как институционального покупателя их продукции. Ключевыми характеристиками лекарственных препаратов являются их качество, безопасность и эффективность. От того, насколько закупаемые лекарственные препараты соответствуют этим критериям, в конечном итоге зависит здоровье людей. Одним из важнейших факторов для рассматриваемой сферы является обращение на рынке лекарственных препаратов разных производителей, но при этом обладающих одинаковым международным непатентованным наименованием (МНН).

АНАЛИЗ НОРМАТИВНОГО ПРОСТРАНСТВА И ПРАКТИКИ ГОСУДАРСТВЕННЫХ ЗАКУПОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Российское законодательство выделяет так называемые оригинальные и воспроизведенные лекарственные средства. Согласно определению, данному в действующей редакции ст. 4 Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», под «оригинальным лекарственным средством» понимается ле-

карственное средство, содержащее впервые полученную фармацевтическую субстанцию или новую комбинацию фармацевтических субстанций, эффективность и безопасность которых подтверждены результатами доклинических исследований лекарственных средств и клинических исследований лекарственных препаратов.

Напрямую взаимосвязанным с оригинальным является воспроизведенное лекарственное средство, то есть лекарственное средство, содержащее такую же фармацевтическую субстанцию или комбинацию таких же фармацевтических субстанций в такой же лекарственной форме, что и оригинальное лекарственное средство, и поступившее в обращение после поступления в обращение оригинального лекарственного средства. В международной практике такие лекарственные средства называются «генерики» или «дженерики».

Производство дженериков существенно менее сложно технологически, а также менее затратно по сравнению с оригинальным препаратом, поэтому они всегда значительно дешевле. Хотя технологические расходы по производству дженериков и оригинальных препаратов одинаковы (необходимость соответствия международным требованиям качества GMP), в случае дженериков в стоимость препарата не включаются расходы, связанные с длительными клиническими испытаниями, так как препарат уже хорошо известен и имеет доказанные и проверенные эффективность и безопасность.

В связи с тем, что государственные расходы на здравоохранение во многих странах ограничены, в настоящее время усилилось внимание к использованию дженериков. Даже в промышленно развитых странах применение воспроизведенных препаратов стимулируется на государственном уровне при непременном соблюдении патентных прав производителей оригинальных препаратов.

В терминологии, принятой на международном уровне, чаще всего используется деление на инновационные или брендированные препараты и дженерики. Следует отметить, что мировое потребление дженериков непрерывно растет [6].

Дженерики создают необходимые условия для здоровой конкуренции на фармацевтическом рынке, стимулируют ее, способствуют разработке инновационных препаратов, защищенных от конкуренции с дженериками в течение всего срока действия патента. В таких условиях производители оригинальных препаратов стараются усовершенствовать уже зарегистрированные продукты, создавая новые, более удобные для использования лекарственные формы (шипучие таблетки, лечебные пластыри и т.д.) или новые дозировки (например, «Но-шпа форте», «Диклофенак ретард» и т.п.).

В настоящее время вступили в силу нормы Федерального закона от 22.12.2014. № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств», в соответствии с которыми в определения рассмотренных понятий будут внесены существенные изменения. Так, понятие «оригинальное лекарственное средство» будет заменено на «референтный лекарственный препарат». В отличие от оригинального лекарственного средства, отличительным признаком которого является содержание впервые полученной фармацевтической субстанции или новой комбинации фармацевтических субстанций, референтный лекарственный препарат характеризуется следующими признаками:

– данный лекарственный препарат зарегистрирован в Российской Федерации;

– качество, эффективность и безопасность этого лекарственного препарата доказаны на основании результатов доклинических исследований лекарственных средств и клинических исследований лекарственных препаратов, проведенных в соответствии с требованиями ч. 3 ст. 18 комментируемого Закона. Следует отметить, что эффективность и безопасность, подтвержденные результатами доклинических исследований лекарственных средств и клинических исследований лекарственных препаратов, характеризуют также и оригинальные лекарственные средства;

– данный лекарственный препарат используется для оценки биоэквивалентности или терапевтической эквивалентности, качества, эффективности и безопасности воспроизведенного или биоаналогового (биоподобного) лекарственного препарата.

Также ст. 4 Федерального закона № 61-ФЗ дополнена толкованием терминов, которые включены в определение референтного лекарственного препарата: терапевтическая эквивалентность; биоаналоговый (биоподобный) лекарственный препарат (биоаналог).

Кроме того, определение воспроизведенного лекарственного средства заменено понятием «воспроизведенный лекарственный препарат».

Воспроизведенный лекарственный препарат соотносится с референтным лекарственным препаратом следующим образом:

– имеет такой же качественный состав и количественный состав действующих веществ в такой же лекарственной форме;

– биоэквивалентен или терапевтически эквивалентен референтному лекарственному препарату, что подтверждено соответствующими исследованиями.

Итак, рынок характеризуется активной конкуренцией оригинальных лекарственных препаратов с дженериками, а также дженериков между собой. И в лечебной практике, и в процедурах госзакупок довольно остро стоит вопрос о возможности их взаимной замены.

Проблема имеет как экономический, так и медицинский аспект.

С одной стороны, важное значение имеет фактор цены, особенно если мы говорим о государственных закупках. Оригинальные препараты в большинстве случаев дороже, чем дженерики (часто в несколько раз), что связано с высокими расходами производителя-инноватора на разработку нового лекарственного препарата. Ограниченность бюджетных средств, выделяемых на здравоохранение, создает давление на государство, заставляя чиновников рассматривать возможность закупки для лечебных учреждений или для обеспечения льготников более дешевых препаратов. Такая тенденция характерна не только для России, но и для развитых государств, в частности для США. И во многих случаях это действительно способ сэкономить бюджетные средства без ущерба для качества лечения.

Как известно, в настоящее время государственные закупки лекарственных препаратов, за некоторым исключением, осуществляются по их МНН, без ссылки на торговое наименование. Таково требование утратившего силу Федерального закона от 21.07.2005 № 94-ФЗ «О размещении заказов на поставки товаров, выполнение работ, оказание услуг для государственных и муниципальных нужд» и нового Федерального закона от 5.04.2013 года № 44-ФЗ «О контрактной системе в сфере закупок товаров, работ, услуг для обеспечения государственных и муниципальных нужд» (далее ФЗ-44).

Таким образом, для лечебно-профилактических учреждений и для отпуска льготникам в аптеках закупаться должны не конкретные зарегистрированные лекарства, а некие абстрактные препараты, соответствующие критериям, установленным заказчиком.

Заказчики детализируют эти критерии в аукционной документации. В соответствии с ФЗ-44 в аукционной документации обязательно должно содержаться указание на МНН. На практике заказчики указывают в техническом задании также форму выпуска (дозировку, путь введения) препарата и ряд других параметров.

Во многих случаях такому детализированному описанию соответствует только один препарат из числа зарегистрированных в государственном реестре лекарственных средств. Можно привести следующие примеры «отсекающих» критериев, которые в своей практике используют заказчики:

– наличие в инструкции по применению лекарственного препарата определенных показаний к применению, указаний на совместимость с другими препаратами (или, наоборот, отсутствие указаний на несовместимость с какими-либо веществами) [7];

– состав вспомогательных веществ (наличие или отсутствие того или иного вещества) [8];

– количество препарата (таблеток, ампул, флаконов и т.д.) в упаковке [9];

– материал, из которого сделана упаковка, а также тип фасовки (например, «пачки картонные», «упаковки ячейковые контурные») [10];

– цвет или форма таблеток, цвет стекла ампул и т.д. [11];

Здесь возникают следующие вопросы, напрямую связанные с проблемой взаимозаменяемости. Может ли поставщик вместо препарата или препаратов, подпадающих под описание заказчика, предложить другой препарат, который соответствует не всем, а только некоторым «основным», «критичным» параметрам аукционной документации? Каковы эти «основные» параметры? Кто и как должен определять возможность такой замены?

Ответ на первый вопрос – если говорить о конкретной процедуре закупок – вроде бы очевиден. Согласно п.2 ч.4 ст. 67 ФЗ-44 участник размещения заказа не допускается к участию в открытом аукционе в электронной форме в случае несоответствия первой части его заявки требованиям документации об аукционе.

На практике (в том числе и в случаях, упомянутых выше) так и происходит. Когда же не допущенный к аукциону поставщик или просто лицо, посчитавшее, что его права нарушены самой формулировкой технического задания, подает соответствующую жалобу в ФАС, возникает новый вопрос: правомерно ли установление в аукционной документации каких-либо дополнительных требований, помимо обязательного МНН.

Право заказчика устанавливать различные требования к объекту закупки прямо вытекает из закона (ст. 33 ФЗ-44). Тем не менее существует и ч. 2 ст. 17 Федерального закона от 26.07.2006 №135-ФЗ «О защите конкуренции», согласно которой запрещается не предусмотренное федеральными законами или иными нормативными правовыми актами ограничение доступа к участию в торгах. В соответствии с ч. 1 ст. 33 ФЗ-44 в описание объекта закупки не должны включаться требования к товарам, если такие требования влекут за собой ограничение количества участников закупки, «за исключением случаев, если не имеется другого способа, обеспечивающего более точное и четкое описание характеристик объекта закупки».

Но какие же требования считать избыточными, ограничивающими круг участников аукциона? Рассмотрим некоторые позиции, из которых исходит Федеральная антимонопольная служба и которые поэтому оказывают значительное влияние на практику деятельности комиссий ФАС по контролю в сфере размещения заказа.

Одна из таких позиций (прямо отраженная во многих решениях ФАС) заключается в том, что установление требований к уникальному составу препарата, объему наполнения флаконов, его упаковке, фасовке и так далее неправомерно, если совокупность таких требований указывает на единственного производителя [12].

Другая важная позиция, также сформулированная в одном из писем [13], такова:

«…в соответствии со статьей 61 закона об обращении лекарственных средств аналогичными лекарственными препаратами являются лекарственные препараты с одинаковыми МНН, одинаковыми лекарственными формами и одинаковыми дозировками… В связи с тем, что химические свойства лекарственного препарата являются его качественными характеристиками и определяют выбор потребителя, ФАС России полагает, что аналогичные лекарственные препараты следует относить к взаимозаменяемым лекарственным препаратам в контексте закона о защите конкуренции».

Избыточную детализацию предлагается рассматривать как нарушение упомянутой ч. 2 ст. 17 Федерального закона от 26.07.2006 №135-ФЗ «О защите конкуренции», согласно которой запрещается не предусмотренное федеральными законами или иными нормативными правовыми актами ограничение доступа к участию в торгах.

Таким образом, основываясь на термине «аналогичный лекарственный препарат» (который в ФЗ-61 используется исключительно для расчета предельных отпускных цен на препараты из перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов), ФАС делает вывод о взаимозаменяемости препаратов с одинаковыми МНН, одинаковыми лекарственными формами и одинаковыми дозировками.

Этот подход противоречит тому, что выше было сказано о проблемах терапевтической эквивалентности лекарств.

Отметим также, что сама практика издания Федеральной антимонопольной службой различных писем и разъяснений относительно взаимозаменяемости конкретных МНН в рамках госзакупок [12, 14] не соответствует общей дефиниции взаимозаменяемости товаров, которое используется в 135-ФЗ для определения продуктовых границ товарного рынка (то есть рынка конкурирующих друг с другом товаров):

- взаимозаменяемые товары – товары, которые могут быть сравнимы по их функциональному назначению, применению, качественным и техническим характеристикам, цене и другим параметрам таким образом, что приобретатель действительно заменяет или готов заменить один товар другим при потреблении (в том числе при потреблении в производственных целях) (п. 3 ст. 4 Федерального закона от 26.07.2006 № 135-ФЗ «О защите конкуренции»).

Как видим, закон о защите конкуренции предполагает использование иного, субъективного критерия взаимозаменяемости: важным является отношение самого приобретателя к возможности замены одного товара другим.

И здесь мы возвращаемся к вопросу о требованиях к закупаемым лекарственным средствам, которые, с точки зрения покупателя, и определяют возможность такой замены. Существует масса примеров того, что на практике он не готов осуществлять замену препаратов только на основании идентичности МНН, лекарственной формы и дозировки.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ НОРМАТИВНОГО ПРОСТРАНСТВА

Установление особенностей описания объекта закупки «лекарственный препарат». Статья 33 Федерального закона «О контрактной системе» определяет общие и частные принципы описания объекта закупки. Так, согласно пункту 6 части 1 указанной статьи заказчик в случае, если объектом закупки является лекарственный препарат, при описании объекта закупки в документации о закупке должен руководствоваться следующим правилом:

- документация о закупке должна содержать указание на международные непатентованные наименования лекарственных средств или при отсутствии таких наименований – химические, группировочные наименования.

В то же время согласно пункту 1 части 1 статьи 33 заказчик при описании объекта закупки в документации при необходимости может указать функциональные, технические, качественные и эксплуатационные характеристики объекта закупки. Используя указанное положение, недобросовестные государственные заказчики устанавливают требования к:

- составу вспомогательных веществ;
- лекарственной форме (например, концентрат или лиофилизат);

- первичной упаковке (например, флакон или ампула);
- совместимости лекарственного препарата с брендированной системой введения;
- комплектации лекарственных препаратов изделиями медицинского назначения (например, шприц с определенной иглой, устройство безопасности иглы, адаптеры);
- объему наполнения флакона при равных дозировках.

Перечисленные характеристики не влияют на терапевтические свойства лекарственных препаратов, однако позволяют говорить о наличии формальных отличий в группе препаратов с идентичным международным непатентованным наименованием, предназначенных для применения по одному и тому же показанию. Как правило, в подобных случаях указанным заказчиком требованиям соответствует единственный лекарственный препарат, как правило, иностранного производства. В результате заявки, содержащие предложения о поставке препаратов с иными торговыми наименованиями, отклоняются.

Искусственное ограничение конкуренции и недопущение к торгам по формальным признакам отечественных лекарственных препаратов, не только не уступающих по качеству, безопасности и эффективности, но и обладающих значительно меньшей стоимостью, негативно сказывается на локальных производителях и наносит существенный ущерб государственному бюджету Российской Федерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ практики государственных закупок лекарственных средств показал, что важным направлением совершенствования механизма государственных закупок является установление особенностей описания объекта государственной закупки «лекарственный препарат» как необходимое условие предоставления преференций локальным производителям. В связи с этим представляется целесообразным реализовать право Правительства Российской Федерации на установление особенностей описания отдельных видов объектов закупок (часть 5 статьи 33 Федерального закона «О контрактной системе»). В случае принятия соответствующего акта Правительства Российской Федерации заказчик при подготовке документации о закупке будет обязан использовать в описании объекта закупки «лекарственный препарат» характеристики, которые не противоречат требованиям статьи 33 Федерального закона «О контрактной системе», с учетом особенностей, установленных Правительством Российской Федерации. Механизм реализации – разработка, согласование и принятие постановления Правительства Российской Федерации «Об установлении особенностей описания объекта закупки при осуществлении закупок лекарственных средств».

ЛИТЕРАТУРА

1. А.А. Лин, С.В. Соколова, А.С. Орлов. Фармацевтический рынок: госпитальный сегмент // Проблемы современной экономики. 2014. № 1 (49). С. 224–230.
2. Б.И. Соколов, А.А. Лин, А.С. Орлов. Фармацевтический рынок: льготное лекарственное обеспечение // Проблемы современной экономики. 2014. № (50). С. 337–341.
3. И.А. Наркевич, Т.А. Баранкина, В.В. Богданов, О.Н. Якименко, Т.Е. Едунова. Оптимизация закупок лекарственных препаратов для стационара многопрофильной медицинской организации // Сибирское медицинское обозрение. 2013. № 2(80). С. 90–93.
4. А.А. Лин, И.А. Наркевич, В.А. Плотников, Е.О. Трофимова. Российский фармацевтический рынок: состояние и тенденции развития // Ученые записки Санкт-Петербургского университета управления и экономики. 2009. № 4 (26). С. 16–23.
5. Д. Мелик-Гусейнов. Таблетки для государства // Российская газета: Фармацевтика. 2010. № 6082 (106). С. 32–48.
6. Р.И. Ягудина, Е.Е. Аринина, Б.Б. Кондратьева. Взаимозаменяемость и замещаемость лекарственных средств // Современная организация лекарственного обеспечения. 2013. № 1. С. 16–20.
7. Постановление ФАС Западно-Сибирского округа от 28.05.2012 по делу № А46-9313/2011.
8. Постановление Арбитражного суда Свердловской области от 16.05.2011 по делу № А60-9889/2011.
9. Постановление ФАС Западно-Сибирского округа от 19.10.2012 по делу № А75-53/2012.
10. Постановление ФАС Волго-Вятского округа от 16.05.2013 г. по делу № А29-6167/2012.
11. Решение Комиссии Управления Федеральной антимонопольной службы по Брянской области по контролю в сфере размещения заказов от 15.10.2009 по делу № 165.
12. Письмо ФАС от 29.04.2013 № АД/17322/13 «О закупках лекарственных препаратов с МНН «эпоэтин альфа».
13. Письмо ФАС от 30 августа 2011 г. № АК/33019.
14. Письмо ФАС России от 12.12.2013 № АК/50317/13 «Разъяснения для применения при проведении торгов на поставку лекарственного средства с МНН сальбутамол в форме.

СПХФА
с 1919 года на службе науке и здоровью нации

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ СТУДЕНТОВ И АСПИРАНТОВ

МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ - ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО

При поддержке

Министерства здравоохранения РФ

Правительства Санкт-Петербурга

VI Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием

«МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО»
25-26 апреля 2016 года

VI Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО» состоится 25 и 26 апреля 2016 года в ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14).
Конференция аккредитована по программе «У.М.Н.И.К.».

Цель конференции - встреча будущих специалистов фармацевтической отрасли со своими потенциальными работодателями.

Тематические направления научной программы конференции 2016 года:

1. Математическое моделирование при разработке лекарственных средств
2. Современные подходы к синтезу лекарственных субстанций
3. Инновационные подходы в биотехнологии
4. Современные исследования и разработки магистрантов в области био- и химической технологии
5. Технология производства инновационных лекарственных средств
6. Методы стандартизации, фармакогностическая и фармакологическая оценка новых лекарственных средств
7. Региональные модели лекарственного обеспечения населения и проблемы фармацевтического производства
8. Гуманитарные проблемы науки и фармацевтического образования

Генеральный спонсор

АПТЕКА «ОЗЕРКИ»
ТРАДИЦИОННО НИЗКИЕ ЦЕНЫ! т.603-0000

Официальный спонсор

BIOCAD
Biopharmaceutical Company

Спонсоры и партнеры

Р-ФАРМ
Инновационные технологии здоровья

ПЕТЕРБУРГСКИЕ АПТЕКИ

veropharm

ООО «САМСОН-МЕД»

GEROPHARM
Pharmaceutical company

ФАРМПРОЕКТ

Генеральный инфопартнер



Стратегический инфопартнер

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

За более подробной информацией обращайтесь в Оргкомитет конференции:
ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А
тел.: (812) 234-57-29
факс: (812) 234-60-44
моб.: +7 (960) 240-33-17
e-mail: conference@pharminnotech.com
сайт: www.ypharm.spcpa.ru

УДК 614.27, 615.11

1 – ЗАО «Ретиноиды», 111123, Россия, г. Москва, ул. Плеханова, 2/46, стр. 5

1 – JSC «Retinoids», b. 5, 2/45, Plekhanova str., Moscow, 111123, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: guzev3@yandex.ru

О ГАЛЕНЕ (СТРАНИЦЫ ЖИЗНИ И ЧЕРТЫ ЛИЧНОСТИ В ОЦЕНКЕ ПОТОМКОВ)[1]

К.С. Гузев[1]*

Резюме. В работе представлены страницы жизни и некоторые черты характера римского врача Галена. Источником информации служили материалы, опубликованные в отечественной и зарубежной литературе.

Ключевые слова: Гален, римский врач, философ, история медицины и фармации.

ABOUT GALEN (PAGES OF LIFE AND TRAITS OF THE PERSON IN THE ASSESSMENT OF THE DESCENDANTS)[2]

K.S. Guzev[1]*

Abstract. The paper presents the pages of life and some character traits of the Roman physician Galen. The source of information is the materials published in domestic and foreign literature.

Keywords: Galen, Roman physician, philosopher, history of medicine and pharmacy.

ВВЕДЕНИЕ

Жизнь Галена многократно описана, в результате чего превратилась в сухое перечисление дат его жизни и деятельности, городов, где он бывал, и трудов, которые он написал. В данной работе мы попытались не столько в очередной раз описать жизненный путь этого великого человека, сколько раскрыть по возможности его характер и некоторые человеческие качества.

Литературными источниками для предпринятого исследования служили прежде всего монография Савелия Григорьевича Ковнера («Очерки истории медицины», 1878–1888) [1], книга V. Nutton («Ancient Medicine», 2004) [2], сообщение P. Starr (2008) [3] и труды самого Галена, подготовленные к печати сотрудниками кафедры истории медицины, истории отечества и культурологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова под руководством проф. Д.А. Балалыкина (2014) [4]. Монография С.Г. Ковнера является, на наш взгляд, первым, если не единственным, полноценным трудом, объективно описывающим вклад Галена в медицинскую науку. Этой теме в ней посвящено 160 страниц. Биографическая часть основывается исключительно на выдержках из трудов самого Галена, т.к. в отличие от других авторов он не оставил после себя полноценной автобиографии. Труд V. Nutton представляет собой учебное пособие по медицине древности, в котором собраны данные о жизни и творчестве Галена, полученные европейскими исследователями. Статья P. Starr – это описание жизни Галена, составленное по арабским источникам XIII в. [перевод книги Muwaffaq ad-Din (умер в 1269), сделанный Ibn Abi Usaybi'a]. Что же касается четвёртой работы, то она уникальна: это первый том трудов Галена, переведённый на русский язык. В нем отдельной главой представлена биография римского врача. Необходимо сразу отметить, что сведения о жизни Галена, представленные в этих источниках, не всегда согласуются между собой. Часто даты расходятся на 1–2 года. Поэтому, если в представленной работе некоторые даты будут отличаться от общепринятых, прошу не обвинять в этом автора. И ещё: при написании этой статьи мы старались максимально цитировать первоисточники, придерживаясь авторского текста.

БИОГРАФИЯ

Гален родился в Пергаме в Азии в 131 г. [4]. По данным V. Nutton, он родился в августе-сентябре 129 г. в богатой семье пергамского архитектора. Прадед Галена был землемером, дед – старшиной гильдии

[1]В работе представлено авторское видение предмета.

[2]The article presents the author's vision of the subject.

СТАТЬЯ ПРИВЕДЕНА В АВТОРСКОЙ РЕДАКЦИИ

плотников, а отец – Элий Никон – известным архитектором. В Пергаме существовало несколько зданий, построенных Никоном. По мнению современников и самого Галена, Никон был человеком большой культуры, специалистом в геометрии, астрономии, архитектуре. Кроме того, отец Галена занимался селекцией винограда и усовершенствовал культуру виноделия. Никон имел римское гражданство, и сам Гален, таким образом, был римским гражданином [2].

Город Пергам (территория современной Турции, город Бергам) в начале второго столетия находился на высоте своего расцвета, в нём развивались различные философские школы, другие науки и ремёсла. Храмы и великолепные дома строились как на территории города, так и за его пределами. В Пергам приезжали дети римской знати завершать своё образование. Город привлекал представителей самых разных профессий. В это время в Пергаме возник медицинский центр – асклепион – с библиотекой, насчитывающей более 200000 томов.

Первоначальное образование Гален получил у отца Никона, обладавшего разносторонними знаниями. Будучи первым наставником своего сына, Никон с раннего возраста привил ему любовь к наукам. Первыми науками, преподанными отцом сыну, были математика (арифметика, счёт), геометрия, архитектура. Любовь к ним Гален пронёс через всю жизнь. Математическая логика, приобретённая в детстве, часто помогала ему и при проведении физиологических опытов, и при лечении больных. Здесь уместно привести высказывание самого Галена из работы «О том, что лучший врач – ещё и философ». Он пишет: «Чтобы знать о природе тела, о разновидностях болезней, а также разбираться в лекарствах, врач должен упражняться в логике. Чтобы быть сведущим в этих исследованиях, он должен презирать деньги и вести умеренный образ жизни; кроме того, он должен обладать всеми познаниями в области философии, логики, физики и этики» [4].

Влияние Никона на Галена было огромно, он не только служил для сына примером нравственности и интеллектуальной строгости, но и направлял его развитие с самой колыбели. Никон призывал сына к работе и днём и ночью, касалось ли это изготовления маленьких деревянных игрушек или занятий в философских школах [4]. Nutton, ссылаясь на ранние арабские источники, пишет, что есть сведения о том, что ученики Галена заявляли, что он раздражал их, т.к. никогда не имел времени ни на игру с игрушками, ни на шутливые разговоры. Таким образом, с раннего детства Гален детским радостям предпочитал приобретение знаний и жизненного опыта [2].

Первоначально Никон стремился вырастить из сына философа, поэтому уделял много времени обучению его философии с 12-летнего возраста. Сам Гален говорит об этом так: «Отец заставлял изучать различные философские течения (догматы различных сект), существовавшие в то время в Пергаме, для того чтобы не быть рабом ни одного из них, быть умеренным, избегать наслаждений и более всего искать истины». В процессе обучения Никон не только подбирал ему учителей, но становился для сына наставником и репетитором. Отец лично сопровождал его на лекции по философии, а позже в спорах закреплял пройденное [1]. Впоследствии Гален осознал правильность довольно строгого отношения отца к сыну и в своих поздних трудах писал: «Я наслаждался выпавшей мне удачей иметь самого лучшего, самого понимающего, негневливого, справедливого и человеколюбивого из отцов». Что же касается матери Галена, то он сам писал о ней следующее: «Моя мать настолько склонна к гневу, что порою даже кусала своих служанок. Она постоянно кричала и корила моего отца, более чем даже Ксантиппа нападала на Сократа» [4]. Можно предположить, что мать была не очень довольна тем вниманием, которое Никон оказывал сыну, лишая этого внимания её. В европейских источниках нет никаких указаний на наличие у Галена братьев или сестёр. Однако в арабских источниках имеются сведения, что у будущего врача была сестра [3]. Несмотря на то, что сам автор (P. Starr) предупреждает, что на Востоке биография Галена претерпела неожиданные и любопытные изменения в связи с появлением значительного количества работ, приписываемых самому учёному, этот факт даёт нам основание предположить, что Гален был единственным сыном в семье и именно поэтому отец уделял его воспитанию так много времени.

Подобное отношение отца к сыну необычно и противоречило общепринятому в Древнем Риме воспитанию мальчиков.

Традиционно детство римских мальчиков было строго расписано по годам. Обучение начиналось с раннего детства. Частные учителя либо у себя дома, либо в общественных местах, или просто в садах собирали детей и за плату обучали их чтению, письму, счёту – учитель произносил буквы и слова, а ученики повторяли их вслух, затем он на вощёной дощечке писал буквы и слова, а ученики списывали их. В подобных начальных школах учились в возрасте 7–12 лет. Следующим звеном школы была «грамматика», где курс обучения длился четыре года. Здесь ученики читали и комментировали отрывки из произведений поэтов и писателей, делали письменные упражнения. С 16 лет ученики переходили в школу «риторики», это можно сравнить с современной высшей школой. Эти школы пользовались большой популярностью, т.к. в империи продолжало цениться искусство красноречия. Они учили своих слушателей искусству построения фраз и изысканности речи [5].

С 17 лет Гален приступил к изучению медицины. Существует легенда о якобы вещем сне Никона, в котором Асклепий (древнегреческий бог врачевания

и медицины) повелел ему посвятить сына врачебному искусству. Об этом упоминают все исследователи биографии Галена. Однако это несколько противоречит существующим в то время традициям и здравому смыслу.

- *Противоречие первое.* Римский народ состоял в основном из двух сословий – воинов и земледельцев [1]. Но основной профессией в Древнем Риме, о которой мечтали все мальчишки и их состоятельные родители, считалась карьера военного. Ребята с раннего детства бредили этим. У маленьких детей были «военные» игрушки, повзрослевшие мальчики бились на мечах, ездили на маленьких колесницах. В связи с этим все сколько-нибудь состоятельные семьи желали видеть своих отпрысков на военной службе [6]. Почему же этого не произошло с Галеном?
- *Противоречие второе.* Известно, что отец Галена был архитектором. Архитектором был и дед Галена [2]. Налицо династия, и продолжать её должен был Гален, однако же этого не происходит. Почему?
- *Противоречие третье.* Почему медицина? Ведь хорошо известно, что римские граждане с презрением относились к врачам. Их предубеждение по отношению к служителям медицины объяснялось презрением к положению общественных групп, из которых выходили врачи: рабы, отпущенные, иностранцы. В итоге свободные римские граждане сторонились медицины и в очень редких случаях посвящали себя этой профессии [7].

Ответы на эти вопросы были найдены по отрывочным сведениям, подчерпнутым в трудах по истории медицины, принадлежащих перу авторитетных учёных.

С одной стороны, есть сведения, что Гален обладал слабым здоровьем [8]. С другой – многие авторы единодушны в том, что само имя Гален происходит от прилагательного «γάληνός» – спокойный, безмятежный. Если учесть, что имена мальчикам в Древнем Риме присваивались лишь на 9-й день жизни, то, вероятно, уже к этому сроку новорождённый показал свой характер, т.е. он был тихим, спокойным, а может быть, и слегка болезненным ребёнком. Намёк на это содержится и в трудах Галена. Вот что он пишет о способностях детей в сочинении «Способ распознавания и лечения страстей…»[1]: «Все, кто наблюдает за детьми, могут назвать их или скромными, или бесстыдными… стремящимися к красоте и совершенству, а других – абсолютно безразличными к этому. Существуют дети трусы или смельчаки, они могут быть по природе правдивы или лживы. Поэтому и стараются дать детям имена сообразно их способностям» [4]. Можно предположить, что, обладая слабым здоровьем, Гален не только не мог быть военным, но и был не способен достойно продолжить дело деда и отца. Вероятно, отец долго думал, чему бы обучить сына, и выбирал все возможные варианты. И не исключено, что именно во сне к нему пришёл ответ на этот сложный вопрос. Следует отметить также, что ко II веку в Древнем Риме изменилось отношение к медицине и врачам. Хорошие врачи имели возможность не только хорошо зарабатывать, но и могли занять достойное место в обществе [7]. Исходя из этого, отец, видя цепкий ум сына, его хорошую память и непреодолимую тягу к знаниям, мог прийти к выводу, что медицина – это та специальность, обладая которой его сын сможет достойно продолжить род, принести много пользы и остаться в памяти потомков.

Нами был найден ещё один довод, который определил поступок Никона. В трактате «Способ распознавания и лечения страстей любой, в том числе и своей собственной, души» Гален пишет: «Мой отец был также сдержан. У многих своих друзей, когда они в запале избивали своих слуг, ударяя их в челюсть, он лечил этих слуг от растяжения сухожилий – результата избиения, порицая избивавших за их гнев» [4]. Эта цитата свидетельствует, что отец Галена имел определённые знания и навыки в лечении некоторых заболеваний, в частности ушибов и растяжений. Несомненно, используя свои знания и умения, он осознавал полезность этого ремесла.

Так или иначе, Никон определил судьбу своего сына и отправил его обучаться медицине. Сначала Гален изучал медицину в родном городе Пергаме, т.к. к тому времени в этом городе сформировался медицинский центр. Анатомию он изучал у Сатирика, патологию – у последователей Гиппократа (Стратоника, Энния Меккия и Эсхриона) [1]. Через 3 года после кончины отца, который завещал ему своё немалое состояние, Гален самостоятельно предпринимает путешествие для пополнения своих знаний. Он посещает Смирну, где слушает лекции анатома Пелопса и философа Альбина, затем переезжает в Коринф и изучает фармакологию и лекарствоведение под руководством Нумезиана. Затем для изучения фармацевтики и естественной истории он предпринял продолжительное путешествие по Малой Азии и, следуя вниз по ликийскому берегу (средиземноморский берег современной Турции), разыскивал чёрный янтарь, или лигнит, а в Палестине – асфальт [4]. Имеются сведения о посещении Галеном Сирии, Палестины, Кипра и Мёртвого моря. Эти путешествия были предприняты Галеном для более детального изучения действия целебных трав, минералов, металлов, смол, пряностей, а также других известных в то время лекарственных препаратов и антидотов [9, 10].

Т. Мейер-Штейнег и К. Зудгов свидетельствуют, что к 20 годам Гален написал свои первые трактаты по философии и медицине [11].

---

[1]«Способ распознавания и лечения страстей любой, в том числе и своей собственной, души».

Наконец, в 152 году Гален прибывает в Александрию, где в течение 4 лет с особым усердием изучает анатомию, а также навигацию и астрономию [1]. Особый интерес для нас представляет информация, которая содержится в работе V. Nutton. Он утверждает, что во время нахождения в Александрии Гален знакомится со свойствами редких препаратов и минералов, обладающих действием лекарств. Там же Гален много времени уделял «книжному образованию» [2], о результатах которого можно судить хотя бы по тому, кого цитирует Гален в своих трудах. Это греческие классики философии, поэзии, медицины: Платон, Еврипид, Пифагор, Аристотель, Гомер, Феогнид, Эзоп, Гиппократ, Гераклит, Митридат, Клеопатра, Цельс, отец и сын Андромахи, Диоскорид. Гален прекрасно знал мифы Древней Греции и часто в качестве примеров приводил богов. Из вышесказанного видно, насколько был широк кругозор Галена, с легкостью цитировавшего как авторов, написавших свои труды в VI в. до Р.Х., так и своих современников. Кроме того, по мнению В.Н. Терновского, к этому времени Гален знал все греческие наречия, а также латинский, эфиопский и персидский языки [8]. Этот перечень, по-видимому, можно значительно расширить, т.к. Галену приходилось общаться с большим кругом пациентов и с ними надо было както понимать друг друга, а лечил он всех – от рабов до императоров.

Приобретя огромные по тем временам знания, Гален возвращается в свой родной Пергам и приступает к практическому врачеванию. Произошло это в конце 157 – начале 158 годов. Он был нанят главным городским священником в качестве врача для работы в одной из гладиаторских школ [4].

Поскольку бои гладиаторов были одним из любимых зрелищ горожан, а на их устройство тратились деньги налогоплательщиков, здоровье гладиаторов было под особым контролем. Как известно, к каждой гладиаторской школе были прикреплены врачи. Они выполняли несколько функций, которые были распределены между ними. Так, одни смотрели за диетой, другие – за физическими нагрузками, третьи следили за соблюдением гигиены. Гален был не простым врачом. По утверждению А. Стрельцова, ему было поручено оказывать помощь раненым гладиаторам, т.е. он должен был присутствовать на спектаклях и в случае необходимости оказывать первую помощь раненым сразу после получения увечья во время выступления на арене [7]. Д.А. Балалыкин добавляет, что Гален уделял раненым гладиаторам особое внимание: он следил за их питанием, вправлял вывихи, обрабатывал и зашивал раны, а также контролировал общее состояние их здоровья. Цитируя M. Meyerhof, Д.А. Балалыкин пишет, что, по словам самого Галена, под его присмотром умерли только два гладиатора, в то время как его предшественник за аналогичный период потерял шестнадцать бойцов [4]. Все авторы отмечают, что благодаря знаниям и умению Гален снискал большое уважение среди жителей города, а верховный жрец, отвечающий за устройство гладиаторских боёв, трижды продлевал с ним договор на работу в городской школе гладиаторов. Анатомический и хирургический опыт, полученный молодым врачом в гладиаторской школе, был уникален: он изучал анатомию на трупах погибших бойцов, проводил хирургические вмешательства, помогая раненым с разнообразными повреждениями. За годы работы в гладиаторской школе Гален убедился в необходимости соблюдения диеты, гигиены, проведения профилактических мероприятий, научился лечить вывихи, переломы и тяжёлые раны [2, 4, 10].

После семи лет работы в гладиаторской школе у Галена начинается следующий этап в жизни. В 162 году он переезжает в Рим и там за короткое время делает блестящую карьеру врача.

Обладая обширными и системными знаниями в медицине, Гален принимает участие во врачебных диспутах, прилюдно проводит анатомические вскрытия животных (собак, свиней, медведей, коров и обезьян), организует публичные физиологические опыты. Не исключено, что Гален делал это с целью привлечь к себе больше внимания. К. Сухомлинов отмечает, что благодаря этому Галену удалось завязать близкие отношения со многими высокопоставленными и выдающимися людьми того времени, и эти связи были во всех отношениях очень полезны для него. С одной стороны, он приобретал возможность познакомить наиболее влиятельные круги столицы со своими идеями и получить от них некоторую защиту от нападок коллег, а с другой стороны, очень скоро они стали предоставлять ему необходимую практику. Гален часто брался лечить безнадежных больных, от которых отказывались другие врачи. Удача сопутствовала ему, репутация крепла, слава бежала впереди [12]. Так или иначе, очень скоро его пациентами стали известные учёные, деятели искусств, философы, сенаторы, консулы, городская власть Рима, члены императорской семьи. Через короткое время его имя стало фигурировать в списке кандидатов в личные врачи императора. В результате широкой известности Гален стал придворным медиком и до конца своей жизни выполнял эту функцию при двух римских императорах – Марке Аврелии и Луции Коммоде. [2, 4]. Этот длительный период жизни Галена (около 30 лет) включает в себя вынужденные переезды из Рима в Пергам и обратно, вызванные конфликтами с менее способными и удачливыми коллегами, эпидемиями, а также войнами, ведущимися римскими императорами. Но несмотря на это, живя при императорском дворе, Гален продолжал писать книги и лечить бесчисленное множество пациентов (бедных и богатых, свободных и рабов) [4]. К сожалению, об этом периоде жизни Галена какой-либо достоверной информации нет.

По одним источникам умер Гален в Риме, по другим – в родном городе Пергаме. Однако общепринятого мнения о времени смерти великого врача нет. Европейские источники утверждают, что Гален умер в 201 году в возрасте 70 лет, в то время как восточные

авторы сходятся во мнении, что Гален умер в 210 году и было ему 80 лет [3].

Итак, биография учёного дошла до нашего времени в значительном объёме, а что известно о личности Галена, особенностях его характера?

Приведём описание внешнего вида Галена по арабскому источнику XIII в.: «Тёмного цвета красивые волосы, тонкие черты лица, широкие плечи, широкие руки, длинные пальцы. Имел прямую походку, когда смеялся, показывал зубы, много болтал и редко молчал, часто проводил время со своими спутниками. При выезде к больному был опрятно одет и источал приятный аромат» [P. Starr, 2008]. Несомненно, что портрет в значительной степени идеализирован, но даже эта незначительная информация позволяет увидеть свободного и независимого, культурного и воспитанного человека.

В интернете мы обнаружили странный портрет. И если бы не подрисуночная подпись, то никто, вероятно, не догадался бы, что это портрет Галена.



«Это портрет Галена. С периода античности не сохранилось ни одного портрета Галена. Единственное античное изображение его было найдено в так называемом манускрипте Юлианы Аниции. Этот значительный, иллюстрированный труд сейчас хранится в том, что раньше было Венской библиотекой. Этот труд был написан в 487 году (а может быть и 512) и являлся свадебным подарком Юлиане Аниции, дочери Аницуса Олибриуса, императора западной империи в 472 году, и его жены Плацидии, дочери Валентиниана Третьего. Этот документ содержит описание и рисунки трав, а также внушительный текст травоведа Диоскорида (который процветал в 60-х годах нашей эры). Портрет Галена находился на третьем листе раздела и был весьма повреждён – большая часть краски облупилась. Этот рисунок был подготовлен для этого издания мистером Т.Л. Поултоном – художником анатомического департамента университетского колледжа. Он работал над увеличенной фотографией этого изображения и восстанавливал рисунок черточка за чёрточкой и в конце концов восстановил все отсутствующие детали» [Portrait of Galen. wellcomeimages.org]

ЧЕРТЫ ХАРАКТЕРА

О характере Галена написано немного. Первое, на что обращаешь внимание, это на его имя, означающее в переводе – «спокойный, безмятежный». Вероятно, он и был таким в раннем детстве. Можно предположить, что отец, видя спокойный нрав сына, захотел отметить в имени эту черту его характера. Однако это продолжалось недолго, почётное положение римского гражданина и семейное богатство сделали Галена независимым и обеспечили возможность заниматься любимым делом [4]. Как отмечают многие исследователи трудов Галена, впоследствии его характер претерпел коренные изменения. Здесь уместно процитировать слова С. Ковнера, специально выделенные в отдельную главу «Черты характера Галена и выполненная им задача»: «Гален в своих сочинениях везде обнаруживает тщеславие, самолюбие, страсть много говорить о себе, рисоваться, он легко приходит в гнев, преклоняется перед своими фетишами, беспощаден к противникам, догматичен, нагружен, словно тяжёлой артиллерией, вескими аргументами, вооружён, как диалектик, отличается обилием цитат и анекдотов, с удивительной лёгкостью владеет плавным языком, на котором писали римские греки». Впоследствии эта цитата стала переходить из одной книги в другую. В подтверждение некоторых положений этой цитаты приведём слова самого Галена из книги «Три комментария на книгу Гиппократа «О природе человека». Он пишет: «Когда моя книга «О стихиях, согласно Гиппократу» стала общедоступной и получила признание всех просвещённых читателей, некоторые неучи, которые, как ни старались, не смогли найти в ней ни одного изъяна и задыхались от зависти, решили, что для того, чтобы опорочить мою книгу, достаточно заявить, что это писание не принадлежит Гиппократу». У С. Ковнера читаем: «Он многоречив, как азиатский уроженец, расплывчат, болтлив, слог его растянут и витиеват, как у ритора, который никогда не затрудняется в поисках выражения, но притом как у ритора, знающего бесконечно много и которому память никогда не изменяет». [1]. V. Nutton добавляет: «Боец, упрямый, педантичный, многословный, в своих работах не скупится на комплименты в свой адрес, однако открытый, практичный, лаконичный и щедрый». И далее: «Сам Гален не преувеличивал излишне своё влияние на своих современников» [2]. Интересно отметить, что, обсуждая извечную проблему «О природе...», Гален изучил все известные на то время сочинения под названием «О природе», написанные древними философами: Платоном, Эмпидоклом, Мелиссом, Алкмеоном, Гераклитом и, конечно, Гиппократом. При подобном подходе к проблеме спорить с ним было не только очень трудно – просто невозможно. Здесь он следует заветам своего отца, требовавшего максимально изучить проблему, прежде чем приступить к спору или просто обсуждению.

Вот ещё одна цитата, свидетельствующая об особенностях характера Галена: «... в Риме в Галене проявились в полной мере дурные стороны характера: склонность к ссорам и спорам, а также хвастливое самомнение». Сам он утверждал, что с презрением относится к известности и популярности, но этому проти-

воречит его стремление заставить заговорить о себе в Риме. Для этого Гален устраивал медицинские чтения для избранного круга лиц, сопровождавшиеся вскрытиями животных и вивисекциями. Т. Мейер-Штейнег и К. Зудгов утверждают, что при этом им руководило не стремление приобрести возможно большее число пациентов, а высокомерие, с которым он относился к своим противникам. При чтении работ Галена, по их мнению, поражает безграничное тщеславие, переоценка своих и недооценка чужих исследований, большая наклонность к болтливой обстоятельности [11]. Член-корреспондент АМН СССР Б.Д. Петров, цитируя Л.З. Мороховца, указывает, что «изложение трудов Галена – труднодоступно, часто сбивчиво, запутанно и многословно». Все эти нелицеприятные характеристики были свойственны, вероятно, молодому Галену. И объясняется это просто: его обширные и систематизированные знания во многих науках, а особенно в медицине, с одной стороны, и малообразованность коллег, с другой стороны, породили Галена-спорщика. Сам Гален, осознавая особенности своей личности, писал: «найдись из тысячи хоть один человек, кто изучит и поймёт мои работы, я достаточно буду вознаграждён за мои усилия…» [13]. Вот лишь несколько цитат из работы А. Стрельцова «Врачи у древних римлян», характеризующих общее состояние медицины в Римской империи:

– медицина в Риме была вполне свободной профессией, и врачом считался всякий, кто выдавал себя за врача;

– в Риме не было общественного медицинского обучения. Первоначально обучение медицине было исключительно практическим и клиническим, т.е. учитель водил с собой учеников к постели больного и учил их распознавать и лечить болезни;

– у римлян не могло быть и речи о вполне строгом разграничении собственно врачей от лиц, которые заявляли себя специалистами в той или иной области врачебного искусства;

– со временем мнение о врачах менялось, им предоставлялись различные преференции, они объединялись в гильдии, некоторые из них богатели и приобретали определённый вес в государстве [7].

Здесь целесообразно привести несколько известных высказываний Галена о своих коллегах, опубликованных в монографии А. Стрельцова.

«Мне часто приходилось водить рукой хирургов, мало изощрённых в анатомии, и тем спасти их от публичного позора».

«Если бы Аполлон или Эскулап предложили им [врачам] себя в учителя, то они и богов не стали бы слушать».

«Шарлатанство и жадность врачей, которые на всё были готовы за деньги, сплошь да рядом нарочно вызывали у больного кризис, чтобы выманить побольше гонорара, часто являются предметом осуждения и сатиры».

«Многие, посвящавшие себя медицине, не умеют как следует читать и предостерегают от варварства и ошибок в разговоре с просвещёнными пациентами».

«Никто в наш век не стремится к истине, но – к богатству, власти и удовольствиям. Кто занимается наукой, кажется безумцем».

«Публика обращается не к лучшим врачам, а к тем, которые более всего потворствуют ей».

«Между разбойниками и врачами разница одна – первые действуют в горах, а вторые – в городе» [7].

Несомненно, когда Гален достиг вершины медицинского искусства и стал архиатром (врачом императорского дома), ему стали неинтересны споры с коллегами, которые лишь раздражали его своей «дремучестью». Он поселился в императорском доме, продолжая писать книги и лечить всех, кто к нему обращался.

Кардинальное изменение характера Галена особенно заметно в его работе «Способ распознавания и лечения страстей любой, в том числе и своей собственной, души» [4], в которой автор разбирает и высказывает своё отношение к таким порокам человеческой души, как гнев, сладострастие, чревоугодие, малодушие, жадность, жажда власти, любовь к славе, зависть, подлость, честолюбие. Вот лишь несколько его высказываний, ставших, по сути, афоризмами:

- «Гнев – самая безумная из всех вещей, которые совершают люди»;
- «Гнев – это болезнь души. Любовь к славе и жажда власти тоже болезни»;
- «Голод – неподходящая причина, чтобы предаваться чревоугодию, а жажда не оправдывает иссушение целого бокала вина за один глоток»;
- «Жадность тоже болезнь. Худшее из всех зол – зависть»;
- «Грех – зло для души, боль – зло для тела» [4].

Интересно отметить, что ни один из авторов не обвиняет Галена в сребролюбии и алчности. Все единогласны в том, что римский врач лечил и бедных, и богатых и денег за свои услуги не брал. Хотя тот же А. Стрельцов утверждает, что «Гален получил за лечение жены бывшего консула и наместника Палестины Боэна 400 солидов» [7]. Вероятно, такие случаи были, но Гален хорошо понимал, что не взять плату у очень богатого человека означало обидеть его.

А вот что пишет сам Гален: «Вы никогда не поступите так же, как я, разделив свою одежду с некоторыми из моих слуг и предоставив другим всё необходимое для пропитания и жизни. Кроме того, вы могли заметить, как я заплатил долги за некоторых людей. Я

трачу всё богатство моего отца, оставленное мне в наследство, ничего не откладываю и не запасаю впрок». Относительно алчности врачей Гален восклицает: «Мы видим, что алчные люди, скорее продавцы лекарств, чем врачи». Он глубоко убеждён, что «превосходство в богатстве не приносит достоинства» и призывает своих учеников к исправлению – «Исправление любого из своих прегрешений всегда трудно для того, кто не желает этого делать» [4].

Была у Галена и другая черта – любовь к книгам, правда, из текста непонятно, была ли это высокая любовь к своим трудам или к книгам вообще. Так, в арабских источниках утверждается: «Среди предметов гордости Галена были его книги в обложке из белого и с переплётом из черного шёлка. На их изготовление он потратил огромные суммы». К сожалению, бóльшая их часть сгорела при пожаре [3].

А вот описание Галена-учёного, для которого дороже всего правда. В поэме французского ученого XI в. Мацера Флоридуса, называемой «Одо из Мена. Свойства трав», при описании свойств корня пиона читаем:

«Корень пиона на шее детей, поражённых падучей,
Им помогает, как это Гален утверждает учёный;
Он повествует, что видел больного падучей ребёнка,
Возрастом был он восьми или около лет, этот мальчик.
Корень пиона обычно носил как лекарство, на шею
Средство повесив; но корень однажды случайно сорвался, –
Тотчас же мальчик упал, а когда привязали на место
Корень, – он сразу поднялся; Гален, досконально желая
Дело проверить, вторично сорвал его с шеи ребёнка,
Вновь тот упал и воспрял, лишь на шею повесили корень;
Так, с очевидностью сила подобной травы проявилась» [14].

Объяснение такого «жёсткого» и беспощадного подхода к изучению свойств лекарств можно найти в трудах самого Галена. Так, в работе «Способ распознавания…»[1] он пишет: «Мой отец приучил меня относиться с презрением к славе и почестям и уважать только правду» [4].

Одни авторы утверждают, что у Галена было много учеников, другие пишут, что из-за его отталкивающих в личном общении качеств, а также из-за того, что современники, как это часто бывает с замечательными людьми, его не во всём понимали, у Галена было мало учеников. Достоверно известно лишь о Глауконе и Эпигене, которых он брал с собой к постели больного [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, дошедшие до наших дней, собранные по крупицам сведения о том, каким человеком был Гален, в значительной степени противоречивы, но всем угодить невозможно. Сам же учёный призывал: «Учитесь у мудрых старцев, проживших благородную жизнь» [4].

Почти два тысячелетия отделяют время, в которое жил Гален, от наших дней. И то, что его имя известно, труды продолжают изучаться и история донесла до нас его заслуги, когда сколько имён кануло в вечность, ещё и ещё раз показывает, какой бесценный вклад в развитие медицины внёс великий врач античной эпохи Клавдий Гален.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Ковнер. Очерки истории медицины. От Платона до Галена включительно. Вып. 3. – М. 1888. 436 с.
2. V. Nutton. Ancient medicine. – Routledge: Taylor& Francis Group, 2004. 486 p.
3. P. Starr. Arab Sources on the Life of Galen // J. of Arts and Sciences Sayt. 2008. № 9. P. 89–99.
4. Гален. Сочинения. Том 1 / Под общ. ред., сост., вступ. ст. и комм. Д.А. Балалыкина; пер. с древнегр. А.П. Щеглова; научн. ред. А.П. Щеглова, Н.П. Шок. – М.: Весть, 2014. 656 с.
5. А.Н. Бадак. История Древнего мира. Древний Рим / А.Н. Бадак. И.Е. Войнич, Н.М. Волчек и др. – Мн.: Харвест, 1998. 864 с.
6. М.Е. Сергеенко. Жизнь древнего Рима. – СПб.: Издательско-торговый дом «Летний Сад», 2000. 368 с.
7. А. Стрельцов. Врачи у древних римлян. Эпиграфические очерки. – 2-е изд. – М.: Типография О.О. Гербека, 1888. 111 с.
8. Клавдий Гален. О назначении частей человеческого тела / Под ред. В.Н. Терновского; перев. с древнегреч. проф. С.П. Кондратьева. – М.: Медицина, 1971. 555 с.
9. Л. Менье. История медицины / Пер. с французского д-ра И.А. Оксёнова. – М.-Л.: Гос. изд-во., 1926. С. 54–55.
10. J. Scarbororough. Galen and Gladiators // Epistem: revista critica di storia delle scienze mediche e biologiche. 2013. V. 5. № 2. P. 98–111.
11. Т. Мейер-Штейнег, К. Зудгов. История медицины / Пер. со второго нем. изд. под ред. д-ра В.А. Любарского и д-ра Б.Е. Гершуни. – М.: Гос. изд-во, 1925. С. 125–137.
12. К. Сухомлинов. Медики, изменившие мир. От Гиппократа до Бурденко. – М.: Эксмо, 2014. 384 с.
13. Абу Али Ибн Сина (Авиценна). Канон врачебной науки. 2-е изд. Кн. 1. – Ташкент: Изд.: «ФАН» Узбекской ССР, 1981. С. XXXVI.
14. Флоридус Мацер Одо из Мена. О свойствах трав. – М.: Медицина, 1976. 272 с.

[1]«Способ распознавания и лечения страстей любой, в том числе и своей собственной, души».

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

büchi glasuster · SKALAR · BUCHI · SYSTAG · ESCO · METTLER TOLEDO · OL pharm PRO

SCHMIZO · INTEGRA · ERWEKA · Agilent Technologies · CHRIST · Julabo · BINDER

Miele PROFESSIONAL · Nabertherm · CISA · Nabertherm · M · IKA · sigma

РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ

скидка 5%
до конца марта 2016 г.*



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

PHARM DESIGN

Pharmaceutical Engineering Company





Компания Pharm Design приобрела обширные знания и богатый опыт в обсласти создания многих видов фармацевтических и биотехнологических объектов, которые позволяют разрабатывать технологию фармацевтического производства

Специалисты компании имеют технологические возможности сочетать навыки проектирования с учетом требований всех производственных процессов.

Мы разработали эффективный подход для выбора и адаптации технологии будущего производства любого типа и сложности.

Современные технологические возможности для реализации проектов любой сложности

- Проектирование фармацевтических предприятий
- Строительство фармацевтических заводов
- Чистые помещения: от проектирования до аттестации и валидации чистых помещений совместимых с GMP EU
- Квалификация проектной документации
- Разработка фармацевтической технологии





Адрес:
197110, Санкт-Петербург, ул. Красного Курсанта, дом 25, литер В, офис 329.

Сайт: phde.ru
Тел.: 7 (812) 448-68-32
7 (499) 110-38-17

ДОСТУПНЫЕ РЕШЕНИЯ В ОБЛАСТИ ВЛАЖНОЙ ГРАНУЛЯЦИИ

ВЫСОКОСКОРОСТНОЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ МИКСЕР-ГРАНУЛЯТОР OlpharmPRO

- Номинальный объем рабочей емкости 1 - 10 л (рабочий объем от 250 г до 2 кг)
- Компактный, настольный вариант исполнения грануляторов объемом до 4,5 л
- Возможность комплектации сменными чашами различных объемов
- Возможность комплектации сенсорной панелью управления с русифицированным интерфейсом
- Емкость приготовления раствора с возможностью управления программным обеспечением системы управления гранулятора и автоматической подачей вспомогательных веществ
- Возможность интегрировать датчик крутящего момента вала основной мешалки для автоматического определения конечной фазы приготовления продукта
- Валидационная поддержка



СИСТЕМЫ ПСЕВДООЖИЖЕННОГО СЛОЯ OlpharmPRO

- Номинальный объем рабочей емкости от 1 до 7 л (рабочий объем от 100 г до 3 кг)
- Доступны различные технология нанесения/распыления вспомогательных веществ – верхнее и нижнее (технология Wurster)
- Узел встряхивания фильтров и датчик их целостности
- Возможность комплектации сенсорной панелью управления с русифицированным интерфейсом
- Приточная камера AHU для точного контроля влажности в камере
- Системы автоматического контроля и управления рабочими параметрами внутри рабочей камеры
- Емкость приготовления раствора с возможностью управления программным обеспечением системы управления и автоматической подачей вспомогательных веществ
- Валидационная поддержка



OL pharm PRO

ПРЕДЛОЖЕНИЕ ДЛЯ ЛАБОРАТОРИЙ РАЗРАБОТКИ И ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ООО "ОЛФАРМ ПРО"
117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3А.
Телефон/Факс: +7 (499) 704-36-09.
E-mail: info@olpharm-pro.ru

ERWEKA®

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» ОТ НЕМЕЦКОГО ПРОИЗВОДИТЕЛЯ ERWEKA

АВТОР

А.С. Кузнецов,

менеджер по продажам
фармакопейного оборудования
ООО «Фармконтракт»

ВВЕДЕНИЕ

Тест «Растворение» предназначен для количественного определения действующего вещества, которое в условиях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации, за определенный промежуток времени должно высвобождаться в среду растворения из твердой дозированной лекарственной формы [1].

Выбор метода зависит от физико-химических свойств твердой дозированной лекарственной формы. Большинство аппаратов, используемых для проведения теста «Растворение», стандартизированно в соответствии с национальными фармакопеями, многие статьи которых гармонизированны между собой. Так, в американской фармакопее (USP) описано 7 методов. Государственная фармакопея Российской Федерации описывает три типа аппаратов для проведения теста «Растворение»:

- ***Аппарат I «Вращающаяся корзинка» (соответствует методу 1 по USP)***
- ***Аппарат II «Лопастная мешалка» (соответствует методу 2 по USP)***
- ***Аппарат III «Проточная ячейка» (соответствует методу 4 по USP)***

Самое главное требование ГФ РФ XIII относительно таких приборов заключается в соответствии геометрическим и техническим нормам, предусмотренным фармакопейной статьей ОФС 1.4.2.0014.15 ГФ РФ XIII.

При всем многообразии производителей тестеров растворения особенно выделяется немецкая компания ERWEKA, которая представляет оборудование, не только отличающееся высоким качеством и надежностью, но и полностью удовлетворяющее всем требованиям ГФ РФ XIII, а также USP и EuPh. Обилие методов исследования и оборудования зачастую ставит в тупик даже самых опытных пользователей, нуждающихся в проведении теста «Растворение» с целью контроля качества или разработки лекарственных средств. Для детального изучения предложенного оборудования и методов рассмотрим более подробно тестеры и комплектующие, предлагаемые производителем ERWEKA для выполнения теста «Растворение» по вышеперечисленным фармакопейным методам.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

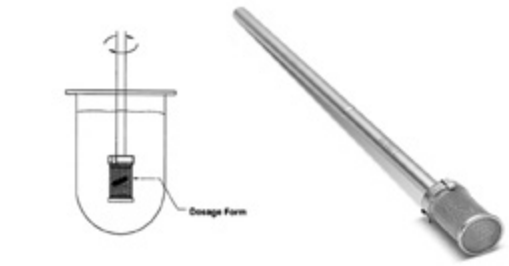
ФАРМАКОПЕЙНЫЕ МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ»

Универсальными приборами для проведения теста «Растворение» являются тестеры серий DT 12x light, DT 72x, DT 82x, DT 14xx, DT 16xx (DT – Dissolution Testers). Основные различия между перечисленными сериями заключаются в степени автоматизации, интерфейсе управления и в проведении квалификации. Внутри каждой серии возможен выбор количества тестирующих станций:

- для тестеров DT 12x light, DT 72x, DT 82x – 6–8 станций;
- для тестеров DT 14xx, DT 16xx – 12 – 14 станций.

Универсальность вышеупомянутого оборудования заключается в том, что при наличии одного тестера растворения возможно проведение исследования растворимости разных лекарственных форм по различным фармакопейным методам, «переходя от метода к методу» не разбирая прибор, а просто меняя оснастку. Наибольший интерес для специалистов, занимающихся исследованием твердых лекарственных форм, представляет различие методов исследования и комплектующих, применяемых в разных случаях, полезная информация о которых будет дана ниже.

Аппарат I «Вращающаяся корзинка» (USP, метод 1)





Тестер растворения ERWEKA DT 126 light

Данный метод применим для исследования растворимости широкого круга лекарственных форм:

1. Капсулы.
2. Гранулы.
3. Формы с замедленным высвобождением и кишечнорастворимые формы.
4. «Всплывающие» образцы.

Основное преимущество данного метода состоит в его надежности: являясь «старейшим» методом, он освещен более чем в двухстах монографиях USP (USA Pharmacopeia). Для тестирования лекарственных препаратов с помощью данного метода нет необходимости в использовании грузиков даже для всплывающих образцов. Главным недостатком данного метода считается возникновение «мертвой» гидродинамической зоны под корзинкой, что замедляет высвобождение активного компонента из лекарственной формы.

Аппарат II «Лопастная мешалка» (USP, метод 2)



Преимуществами данного метода является простота в использовании, легкость перехода на другие методы, а также возможность применения для довольно обширного круга лекарственных форм: капсул, гранул, форм с замедленным высвобождением и кишечнорастворимые форм. Недостатки данного метода заключаются в сильном влиянии гидродинамики жидкости на процесс растворения, а также в неопределенном положении образца (прилип или плавает).

Аппарат III «Проточная ячейка» (USP, метод 4)

Аппарат III «Проточная ячейка» является более экзотическим для российских пользователей, чем вышеупомянутые приборы, однако он просто незаменим при анализе следующих лекарственных форм:

1. Малорастворимые лекарственные средства.
2. Нанопорошки.



3. Импланты, стенты.
4. Суппозитории.
5. Лекарственные формы с контроллируемым высвобождением лекарственных средств.

К преимуществам данного метода можно отнести простой процесс смены среды, возможность работы по сложному pH-профилю, а также возможность организации систем типа «открытая петля» и «закрытая петля». Существенными минусами данного метода являются потребление большого количества среды за тест (система «открытая петля»), а также трудоемкость самого тестирования и обработки результатов.

Существует ряд методов исследования растворимости различных лекарственных средств, которые не описаны в ГФ РФ XIII и, соответственно, являются менее распространенными. Однако в ряде случаев проведение теста «Растворение» просто невозможно без использования следующих методов:

- USP, метод 3: «Качающийся цилиндр».
- USP, метод 5: «Лопасть над диском».
- USP, метод 6: «Вращающийся цилиндр».
- USP, метод 7: «Качающийся держатель».

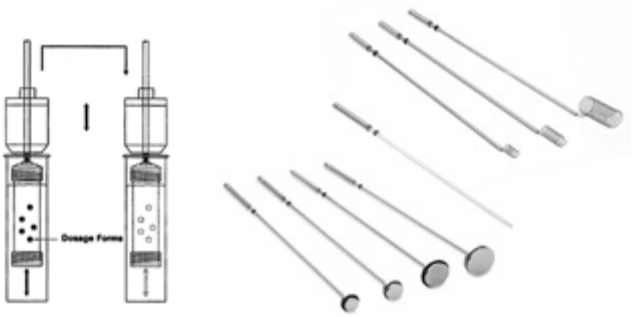


Тестер растворения «Проточная ячейка» ERWEKA DFZ

Так как эти методы используются значительно реже, чем описанные выше, их тщательное изучение представляет огромный интерес.

USP, метод 3: «Качающийся цилиндр» и USP, метод 7: «Качающийся держатель»

Прибор, предлагаемый ERWEKA для проведения теста «Растворение» по методу USP 3: Качающийся цилиндр и USP 7: Качающийся держатель – это многофункциональный тестер растворения BioDis RRT 10, который предназначен для поточного анализа образцов в разных средах за максимально короткое время при совместном проведении процесса. Прибор представляет собой 6 или 8 линейных подставок, вмещающих по 6 станций для анализа и 2 опорные ячейки, вместо которых можно поставить ещё одну испытательную станцию.



Линейные подставки с испытательными станциями погружаются во вместительную водяную баню, выполненную из акрилового стекла, оснащённую выпускным водяным клапаном, что значительно облегчает чистку. Конструкция бани обеспечивает равномерное протекание нагретой жидкости.

Количество образцов и методов исследования может варьироваться, и поэтому все параметры устанавливаются в процессе проведения анализа для каждой из шести линеек проб отдельно. Каждая исследовательская станция автоматически закрывается защитным покрытием. Изменение интервалов и скорости движения для каждой линейной подставки может выбираться индивидуально. Контроль и управление процессом осуществляется с помощью сенсорного экрана.

Данный метод применим для следующих лекарственных форм:

1. Капсулы.
2. Гранулы.
3. ЛФ с замедленным высвобождением и кишечнорастворимые формы.



ERWEKA BioDis RRT

4. Препараты, для исследования которых необходимо осуществлять процесс растворения со сложным pH-профилем.

Достоинства данного метода заключаются в его незаменимости при анализе вышеупомянутых лекарственных форм в нестандартных условиях, а также возможность влияния на гидродинамический режим теста «Растворение» путем варьирования глубины погружения тестовой ячейки (цилиндра). Пожалуй, единственным недостатком данного метода является небольшой объем сосудов для исследования и соответственно среды растворения – 300–1000 мл.

USP, метод 5: Лопасть над диском



Другой не менее важный метод для анализа лекарственных средств – USP 5: «Лопасть над диском», который аналогичен USP 2: «Лопастная мешалка». Только в случае метода «Лопасть над диском» исследуются не перроральные лекарственные формы, а различные трансдермальные формы и эмульсии. В этом случае трансдермальный препарат, например пластырь, помещается на диск, над которым происходит перемешивание среды за счет движения мешалки. Несомненным плюсом данного метода представляется использование стандартного оборудования, применяемого для метода USP 2 в совокупности с диском. Следует отметить, что ограничивает область применения данного метода размер диска (например, площадь пластыря не должна превышать площади диска).

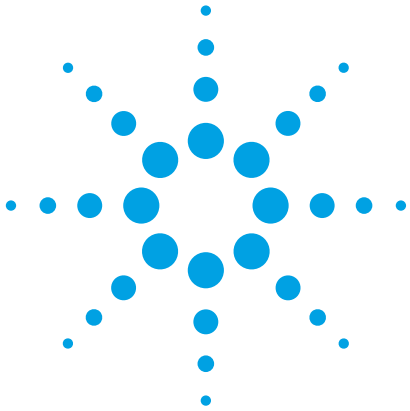
USP, метод 6: Вращающийся цилиндр



В случае невозможности использования метода «Лопасть над диском» для анализа крупных пластырей можно использовать метод USP 6: «Вращающийся цилиндр». Преимущества данного метода заключаются в возможности использования стандартного оборудования и больших объемов среды. Незначительным неудобством данного метода является сложность крепления пластыря тыльной стороной.

ЛИТЕРАТУРА

1. ОФС 1.4.2.0014.15. Государственная фармакопея РФ. XIII изд. – М. 2015. URL: http://femb.ru/feml (дата обращения 20.01.2016).



ОДНОВРЕМЕННЫЙ АНАЛИЗ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ В ПЛАЗМЕ ПОСРЕДСТВОМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ (ТФЭ) С ПОМОЩЬЮ ПРОДУКТОВ AGILENT BOND ELUT PLEXA И СИСТЕМЫ ЖХ-МС-МС AGILENT 1260 INFINITY

Рекомендации по применению

Биофармацевтические препараты

АВТОР

Майк Чанг (Mike Chang)

Agilent Technologies, Inc.

АННОТАЦИЯ

Многокомпонентный анализ шести системных противогрибковых лекарственных препаратов в плазме крови человека эффективно выполняется посредством системы ЖХ-МС-МС от Agilent, включающей полимерный сорбент Agilent Bond Elut Plexa, колонку Agilent Pursuit XRs$^{Ultra\ 2.8}$ Diphenyl и трехквадрупольный жидкостный хромато-масс-спектрометр (ЖХ-МС) Agilent 1260 Infinity LC.

Сорбент Agilent Bond Elut Plexa обеспечивает получение исключительно чистых проб, что подтверждается обнаружением аналитов в количествах вплоть до пикограммовых. Для всех соединений отношения найденных содержаний к истинным в эталонных образцах были близки к 100% при относительном стандартном отклонении менее 10%. Для калибровочных кривых была достигнута превосходная линейность с $R^2 \geq 0{,}995$ для всех соединений.

ВВЕДЕНИЕ

Системные противогрибковые лекарственные препараты предназначены для лечения грибковых инфекций человека. Имеется информация о многих однокомпонентных методиках анализа; однако многокомпонентные анализы с низкими пределами обнаружения отличаются ограни-

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Agilent Technologies

ченной доступностью и пока не применяются [1–4]. Высококачественный планшет Agilent для твердофазной экстракции (ТФЭ) с монодисперсным полимерным сорбентом, Bond Elut Plexa, обеспечивает получение чистых проб и позволяет добиться пределов обнаружения на уровне нескольких пикограммов (пг) для противогрибковых лекарственных препаратов в плазме крови человека. В этих методических рекомендациях представлены данные о хорошем воспроизведении содержаний, линейности и воспроизводимости результатов для противогрибковых лекарственных препаратов в плазме крови человека.

На рисунке 1 представлены примеры системных противогрибковых лекарственных препаратов.

ВЕЩЕСТВА И МЕТОДИКИ

Реактивы и растворы для ТФЭ

Сорбент ТФЭ:	96-луночный планшет Bond Elut Plexa от компании Agilent (10 мг) (кат. номер A4969010)
Проба:	100 мкл плазмы крови человека с добавлением противогрибковых лекарственных препаратов*
Аммиак:	2%-й водный раствор аммиака: добавить 1 мл NH_4OH к 50 мл воды
Метанол:	чистый для анализа или более высокой степени чистоты, 10%-й раствор метанола: добавить 10 мл метанола к 90 мл воды

* Дифеноконазол, внутренний стандарт, добавлялся в концентрации 50 нг/мл во все пробы.

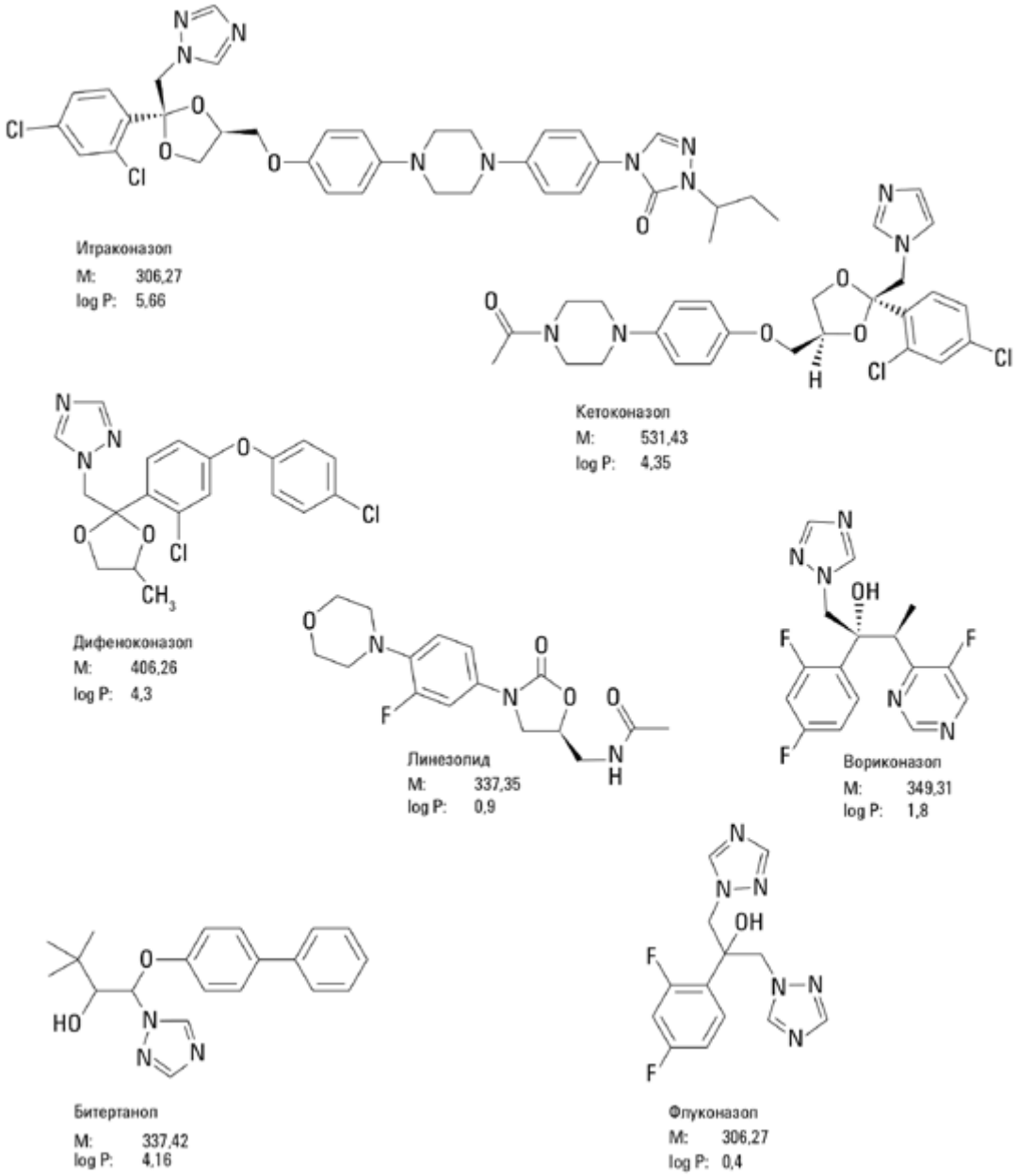


Рисунок 1. Структура некоторых системных противогрибковых лекарственных препаратов

Методика ТФЭ

1.	Предварительная подготовка	Развести в 300 мкл 2%-го водного раствора аммиака
2.	Условия	1. 500 мкл метанола 2. 500 мкл воды
3.	Загрузка	400 мкл разбавленной пробы со стадии предварительной подготовки (фактическое количество плазмы – 100 мкл)
4.	Промывка	500 мкл 10%-го раствора метанола
5.	Элюирование	Дважды элюировать 250 мкл метанола
6.	Выпаривание / повторное растворение	Выпаривание в слабом токе воздуха при комнатной температуре и повторное растворение в 100 мкл 30%-го раствора метанола

Калибровочные пробы готовились в диапазоне концентраций от 0,05 до 100 нг/мл в плазме крови человека при значениях концентраций 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 и 100 нг/мл. Для итраконазола, линезолида и битертанола в связи с пределами обнаружения использовали диапазон концентраций от 0,5 до 100 нг/мл.

УСЛОВИЯ ЖХ-МС

Колонка	Agilent Pursuit XRsUltra 2.8 Diphenyl, 2 x 50 мм (кат. номер A7521050X020)	
Прибор	Трехквадрупольная система ЖХ-МС Agilent 1260	
Подвижная фаза А	0,1%-й водный раствор муравьиной кислоты	
Подвижная фаза В	Метанол	
Скорость потока	0,4 мл/мин	
Вводимый объем	5 мкл	
Градиент		
Время	(мин)	% В
	0	30
	2	85
	4	95
	5	95
	5,1	30
	7	30
Температура	Проба и колонка при температуре окружающей среды	
Ионный источник	Усовершенствованный источник с ионизацией распылением в электрическом поле в режиме положительных ионов (ESI+) с технологией термоградиентной фокусировки Jet Stream (JST) от Agilent	
Температура газа	300 °C	
Расход газа	13 л/мин	
Давление газа распылителя	3,1 бар (45 psi)	
Температура газовой оболочки	350 °C	
Расход оболочечного газа	12 л/мин	
Напряжение на капилляре	4000 В	

Пробы:

Противогрибковый препарат	log P	Отслеживаемый переход МС-МС		Энергия столкновений	Потенциал фрагментора
Флуконазол	0,4	307,1	238,1	12	92
Кетоконазол	4,35	531,2	82,2	50	164
Итраконазол	5,66	705,3	392,2	36	200
Линезолид	0,9	338,2	148,1	44	128
Вориконазол	1,8	350,1	281,1	12	92
Битертанол	4,16	338,2	70,1	4	128
Дифеноконазол (внутренний стандарт)	4,3	406,1	251	24	128

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 2 показано, что все соединения были хроматографически разделены на уровне базовой линии и с хорошим удерживанием с помощью колонки Agilent Pursuit XRs$^{Ultra\ 2.8}$ Diphenyl.

С трехквадрупольной системой ЖХ-МС Agilent 1260 Infinity для большинства соединений достигались отличные пределы обнаружения в плазме крови человека, вплоть до уровня 0,05 нг/мл.

Все соединения продемонстрировали прекрасную линейность с $R^2 \geq 0{,}995$ во всем диапазоне калибровки (рисунок 3).

Для четырех уровней концентрации с n=6 пробами был выполнен эксперимент по воспроизведению заданных содержаний 1, 5, 50 и 100 нг/мл в плазме крови человека. Большинство соединений продемонстрировали высокую точность воспроизведения содержаний и отличные значения относительных стандартных отклонений (% RSD) для всех уровней концентрации.

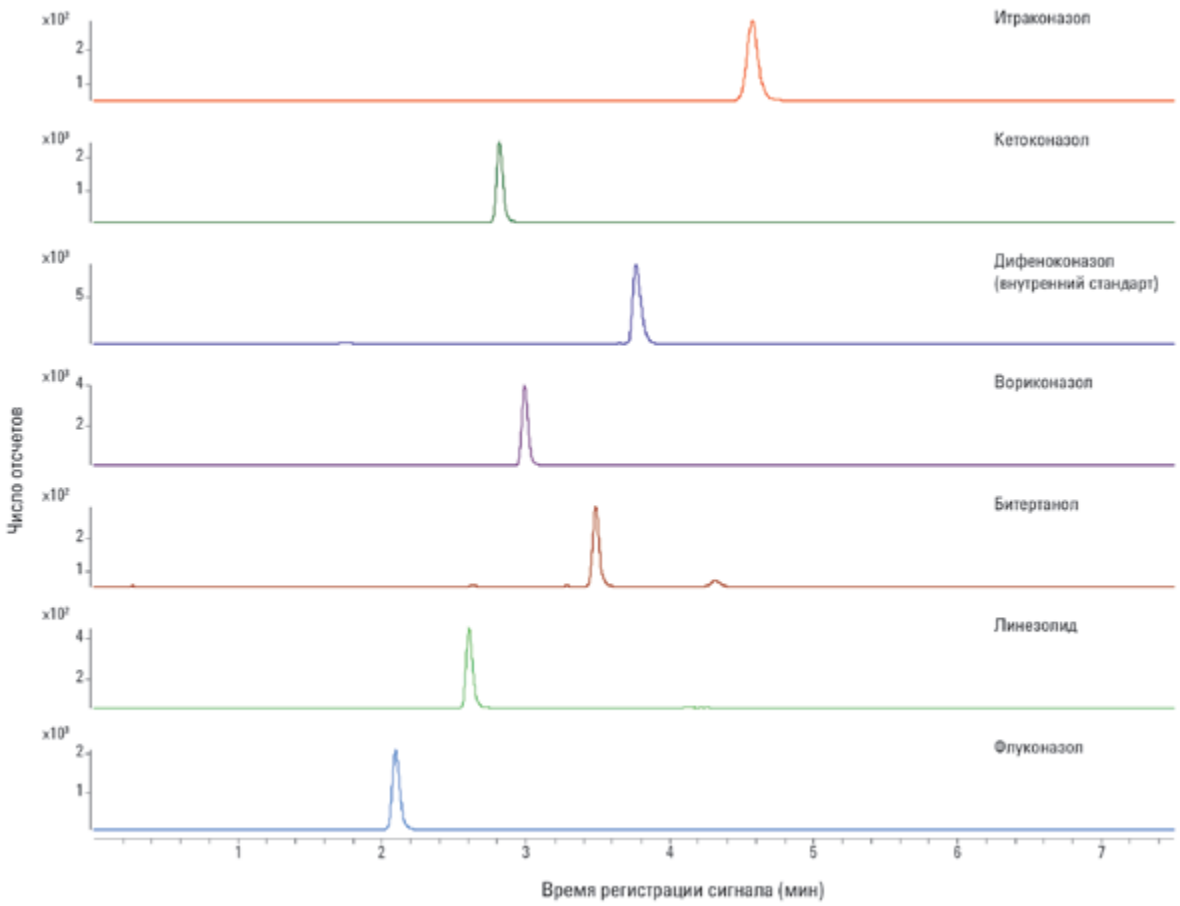


Рисунок 2. **Хроматограмма с масс-спектральным детектированием для противогрибковых лекарственных препаратов при концентрации 10 нг/мл, добавленных в плазму крови человека (также добавлялся внутренний стандарт с концентрацией 50 нг/мл)**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для нескольких противогрибковых лекарственных препаратов в плазме крови человека была разработана воспроизводимая и точная аналитическая методика. Сорбент Agilent Bond Elut Plexa обеспечивает получение чистых проб, что подтвердило обнаружение противогрибковых препаратов на уровне вплоть до пикограмм. Для всех соединений отношения найденных содержаний к истинным в эталонных образцах были близки к 100% при относительном стандартном отклонении менее 10% для n=6 проб. Для калибровочных кривых была достигнута превосходная линейность с $R^2 \geq 0{,}995$ для всех соединений.

	Предел обнаружения (LOD) (нг/мл)	Предел количественного определения (LOQ) (нг/мл)	Содержание в % от эталонного значения	1 нг/мл RSD (%)	Содержание в % от эталонного значения	5 нг/мл RSD (%)	Содержание в % от эталонного значения	50 нг/мл RSD (%)	Содержание в % от эталонного значения	100 нг/мл RSD (%)	Коэффициент корреляции R^2
Флуконазол	0,05	0,05	104	1,7	97	3,8	100	1,4	105	2,1	0,998
Кетоконазол	0,05	0,1	101	1,6	101	2,6	104	3,4	106	4,5	0,999
Итраконазол	0,5	0,5	93,4	5,1	97,8	4,7	88,6	4,1	85,3	5,2	0,995
Линезолид	0,5	1	103	1,9	103	2,5	102	2,5	110	2,2	1
Вориконазол	0,05	0,1	96,8	2,1	94,4	4,4	91,9	8,2	93,4	8,8	1
Битертанол	0,5	1	102	5,9	99,5	3,9	107	1,4	106	3,5	0,997

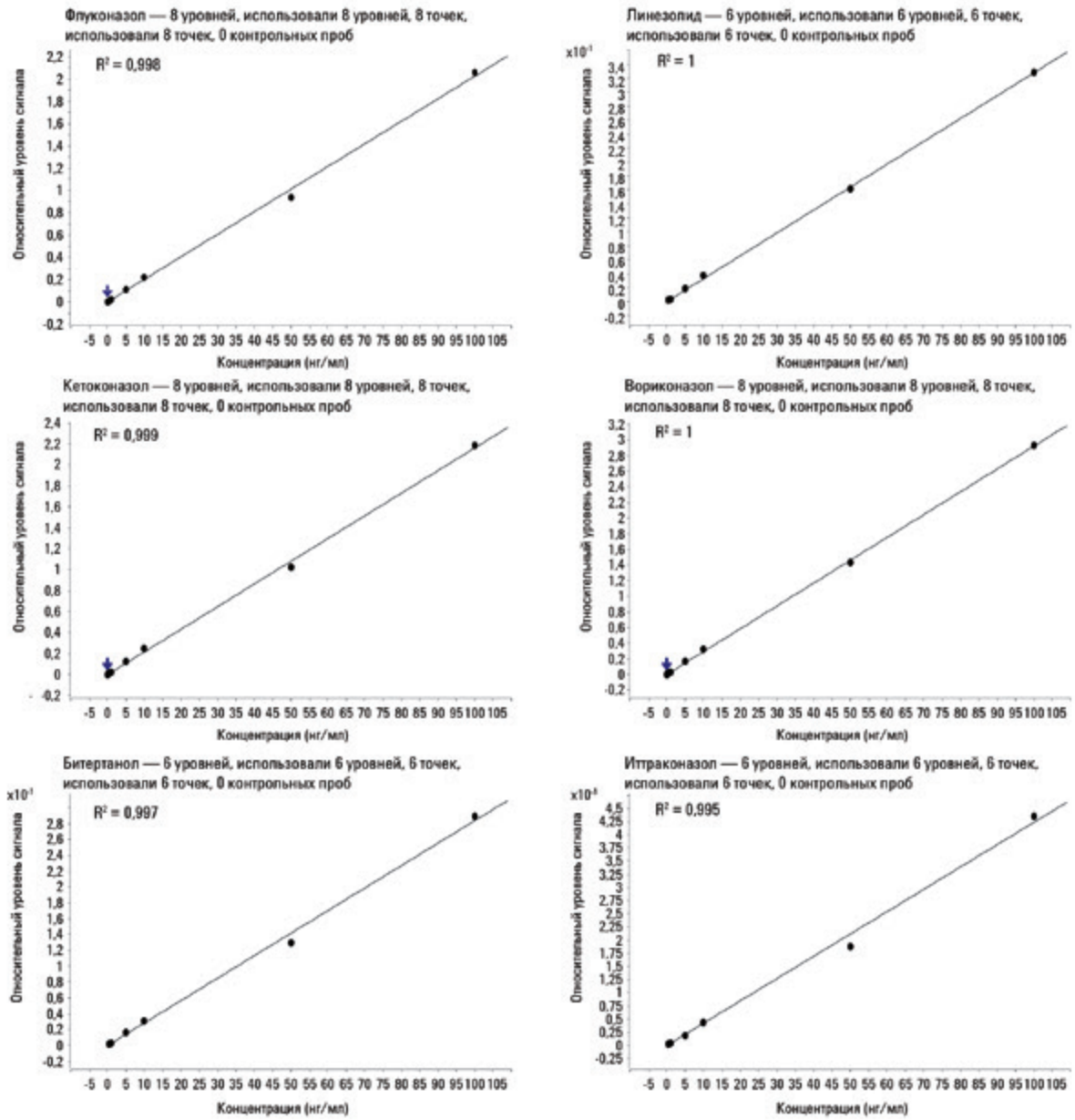


Рисунок 3. Калибровочные кривые для противогрибковых лекарственных препаратов в плазме крови человека в диапазоне от 0,05 до 100 нг/мл (использовались итраконазол, линезолид и битертанол в диапазоне концентраций от 0,5 до 100 нг/мл из-за предела обнаружения)

ЛИТЕРАТУРА

1. K.Y. Beste, O. Burkhardt, and V. Kaever. Rapid HPLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of four routinely administered triazole antifungals in human plasma // Clinica Chimica Acta. 2011. V. 413. P. 240–245.
2. R.J. Mitchell, R. Christian, H. Hughes, A. Miah, and D.K. Walker. The application of fully automated on-line solid phase extraction in bioanalysis // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2010. V. 52. P. 86–92.
3. M-C. Verdier, D. Bentuй-Ferrer, O. Tribut, and E. Bellissant. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of four triazole antifungal agents in human plasma // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2010. V. 48 (10). P. 1515–1522.
4. B.V. Araujo, D.J. Conrado, E.C. Palma, and T. Dalla Costa. Validation of rapid and simple LC-MS/MS method for determination of voriconazole in rat plasma // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007. V. 44. P. 985–990.

Agilent Technologies

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДАМИ ВЭЖХ И УВЭЖХ. СОВМЕСТИМОСТЬ С РАЗРАБОТАННЫМИ РАНЕЕ СЕРТИФИЦИРОВАННЫМИ АНАЛИТИЧЕСКИМИ ПРОЦЕДУРАМИ И МЕТОДИКАМИ – СРАВНЕНИЕ СИСТЕМ ВЭЖХ AGILENT 1290 INFINITY И AGILENT 1290 INFINITY II

Методические рекомендации

Низкомолекулярные лекарственные средства

АВТОР

Соня Шнайдер (Sonja Schneider)

Agilent Technologies, Inc.
Вальдбронн, Германия

АННОТАЦИЯ

В аналитических лабораториях, отвечающих стандартам надлежащей практики, система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity стала прибором № 1 для проведения анализов методом УВЭЖХ, сочетая безупречную достоверность и надежность результатов наряду с высочайшими рабочими характеристиками. Система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II задает новые стандарты эффективности. Лидирующая технология УВЭЖХ, которая применяется в системе ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II, обеспечивает максимальную эффективность благодаря своим рабочим возможностям и скорости работы. В данной статье описано выполнение анализа методами ВЭЖХ и УВЭЖХ на обеих системах. Было решено выбрать ряд противоэпилептических препаратов в качестве модельных компонентов для имитации типичного анализа, проводимого при разработке или контроле качества фармацевтических препаратов. Результаты сравнивали на предмет воспроизводимости, разрешения, линейности и чувствительности. Производительность системы ВЭЖХ 1290 Infinity II в отношении анализа фармацевтических препаратов может считаться эквивалентной или более высокой, что значительно упрощает повторную валидацию и перенос методик.

Agilent Technologies

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ВВЕДЕНИЕ

Система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity является не только одной из наиболее мощных систем УВЭЖХ, присутствующих на рынке, но и наиболее легко приспосабливаемой. Система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity подходит для широчайшего круга задач, от традиционных методик ВЭЖХ до самых сложных процессов, использующих УВЭЖХ.

Благодаря высокой емкости автосамплера и ускоренным циклам ввода проб система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II позволяет добиться высокого пробопотока для любых задач и расширяет возможности максимально эффективной работы лаборатории, а также эффективного использования приборов и проведения аналитических исследований. Для фармацевтической промышленности особенно важна возможность беспроблемной интеграции в существующую инфраструктуру и плавного переноса методик с приборов прежних версий. Основные конструктивные особенности системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II позволяют беспрепятственно перейти к более высокой производительности при меньших затратах. Система ВЭЖХ 1290 Infinity II обеспечивает:

- наиболее низкую дисперсию пиков для достижения наиболее высокого разрешения;
- максимальную емкость пиков для сложных разделений;
- минимальный эффект памяти для наивысшего качества данных [1];
- уникальные возможности детектирования для качественного и количественного анализа;
- наивысшую точность времени удерживания для надежной идентификации пиков [2];
- высокую производительность при малой занимаемой площади;
- ускоренные циклы ввода проб благодаря системе ввода с двойной иглой.

Благодаря ряду конструктивных особенностей (большая вместимость, процедуры работы с иглами, снижение эффекта памяти) автосамплер Agilent 1290 Infinity II Multisampler может работать с множеством различных типов проб и аналитов без необходимости дополнительного вмешательства. Благодаря насосу, который может работать в широком диапазоне мощностей (до 1300 бар), и высокочастотному УФ-детектированию (до 240 Гц) система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II представляет собой оптимальную систему УВЭЖХ, позволяющую успешно решать самые сложные задачи качественного и количественного анализа фармацевтических препаратов и веществ.

В данной статье представлено сравнение рабочих характеристик ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity и ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II при проведении анализа противоэпилептических препаратов в качестве модельных компонентов для имитации типичного анализа, проводимого при разработке или контроле качества фармацевтических препаратов. Системы оценивали по воспроизводимости, разрешению, линейности и чувствительности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование

Система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity состоит из следующих модулей:

- бинарный насос Agilent 1290 Infinity (G4220A), оборудованный смесителем Jet Weaver объемом 35 мкл;
- автосамплер Agilent 1290 Infinity (G4226A);
- термостат Agilent 1290 Infinity (G1330B);
- термостатированный колоночный модуль Agilent 1290 Infinity (G1316C);
- детектор на основе диодной матрицы Agilent 1290 Infinity (G4212A), оснащенный кассетной проточной кюветой Max-Light с длиной оптического пути 10 мм.

Система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II состоит из следующих модулей:

- высокоскоростной насос Agilent 1290 Infinity II (G7120A);
- автосамплер Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B), оборудованный системой охлаждения проб (опция #100);
- многоколоночный термостат Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat (G7116B);
- детектор на основе диодной матрицы 1290 Infinity II DAD (G7117B), оснащенный кассетной проточной кюветой Max-Light с длиной оптического пути 10 мм.

Колонки

- Agilent ZORBAX SB-C18, 4,6×150 мм, 5 мкм (кат. № 883975-902)
- Agilent ZORBAX RRHD SB-C18, 2,1×50 мм, 1,8 мкм (кат. № 857700-902)

Программное обеспечение

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition для систем ЖХ и ЖХ-МС, версия C.01.07.

Растворители и пробы

Растворители

Растворитель A – вода

Растворитель B – ацетонитрил

Проба

Использовали смесь семи традиционных противоэпилептических препаратов (2-этил-2-фенилмалонамид, этосуксимид, примидон, карбамазепин, фенитоин, карбамазепин-10,11-эпоксид и стирипентол, 25 нг/мкл каждого) с кофеином в качестве вещества сравнения.

Все применяемые растворители имели класс чистоты «для ВЭЖХ». Свежая вода высшей степени чистоты была получена в системе Milli-Q Integral, оборудованной патроном конечной очистки с мембраной с размером пор 0,22 мкм (Millipak). Стандарты противоэпилептических препаратов были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США).

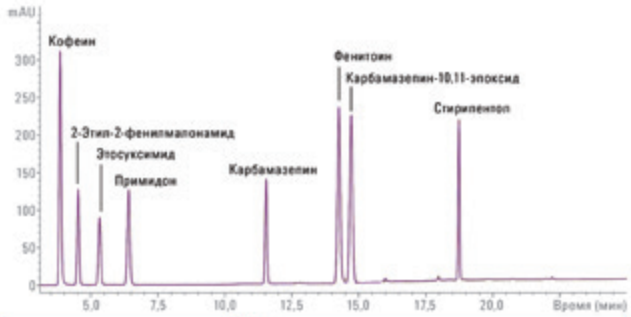
Хроматографические условия

ВЭЖХ с колонкой 4,6 × 150 мм, 5 мкм	
Подвижная фаза	A) Вода B) Ацетонитрил
Скорость потока	0,8 мл/мин
Градиент	0 мин – 15% B 8 мин – 22% B 9 мин – 30% B 13 мин – 35% B 17 мин – 70% B 20 мин – 95% B
Время окончания	25 мин
Время промывки колонки после анализа	15 мин
Вводимый объем	5 мкл
Температура колонки	60 °C
Детектирование	Сигнал A 204/4 нм, опорная длина волны 360/80 нм Ширина пика > 0,025 мин (время отклика 0,5 с) Скорость сбора данных 10 Гц
УВЭЖХ с колонкой 2,1 × 50 мм, 1,8 мкм, простой перенос методики	
Подвижная фаза	A) Вода B) Ацетонитрил
Скорость потока	0,2 мл/мин
Градиент	0 мин – 15% B 2,67 мин – 22% B 3,00 мин – 30% B 4,33 мин – 35% B 5,67 мин – 70% B 6,67 мин – 95% B
Время окончания	8,50 мин
Время промывки колонки после анализа	5 мин
Объем ввода	1,25 мкл
Температура колонки	60 °C
Детектирование	Сигнал A 204/4 нм, опорная длина волны 360/80 нм Ширина пика > 0,025 мин (время отклика 0,5 с) Скорость сбора данных 10 Гц
УВЭЖХ с колонкой 2,1 × 50 мм, 1,8 мкм, перенос методики с оптимизацией по скорости	
Подвижная фаза	A) Вода B) Ацетонитрил
Скорость потока	1,5 мл/мин
Градиент	0 мин – 15% B 0,30 мин – 22% B 0,35 мин – 30% B 0,5 мин – 35% B 0,65 мин – 70% B 0,8 мин – 95% B
Время окончания	1 мин
Время промывки колонки после анализа	1 мин
Объем ввода	1,25 мкл
Температура колонки	80 °C
Детектирование	Сигнал A 204/4 нм, опорная длина волны 360/80 нм Ширина пика > 0,0031 мин (время отклика 0,063 с) Скорость сбора данных 80 Гц

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

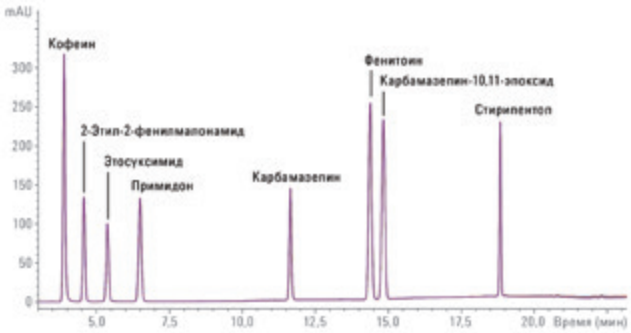
Стандарты противоэпилептических препаратов анализировали в условиях ВЭЖХ с помощью системы ВЭЖХ 1290 Infinity (рисунок 1). Чтобы установить воспроизводимость времени удерживания, площади пиков и разрешения, провели шесть последовательных анализов. Значения относительного стандартного отклонения (RSD) для времени удерживания и площади пиков оказались очень низкими и составили менее 0,047% и 0,65% соответственно.

Стандарты противоэпилептических препаратов также анализировали в условиях ВЭЖХ с помощью системы ВЭЖХ 1290 Infinity II (рисунок 2). Чтобы установить воспроизводимость времени удерживания, площади пиков и разрешения, провели шесть последовательных анализов. Значения RSD для времени удерживания и площади пиков также оказались очень низкими, даже ниже чем при анализе на ВЭЖХ 1290 Infinity, и составили менее 0,042 и 0,15% соответственно.



	RSD для времени удерживания (%)	RSD для площади пиков (%)	Разрешение
Кофеин	0,040	0,153	9,0
2-Этил-2-фенилмалонамид	0,043	0,083	4,8
Этосуксимид	0,041	0,248	5,2
Примидон	0,046	0,143	6,3
Карбамазепин	0,018	0,203	32,1
Фенитоин	0,019	0,163	16,4
Карбамазепин-10,11-эпоксид	0,015	0,648	2,3
Стирипентол	0,007	0,533	7,4

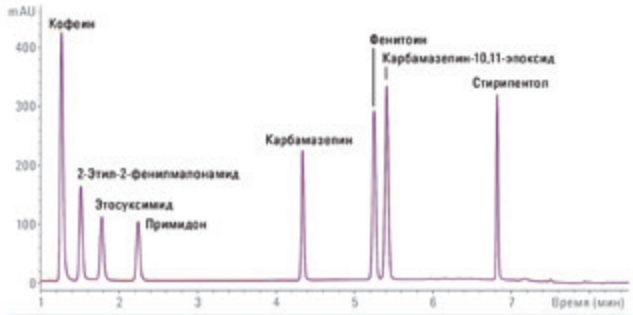
Рисунок 1. Анализ методом ВЭЖХ семи противоэпилептических препаратов и кофеина (наложение хроматограмм шести последовательных анализов) на колонке Agilent ZORBAX SB-C18, 4,6×150 мм, 5 мкм, с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity



	RSD для времени удерживания (%)	RSD для площади пиков (%)	Разрешение
Кофеин	0,035	0,064	4,3
2-Этил-2-фенилмалонамид	0,039	0,073	4,8
Этосуксимид	0,031	0,111	5,2
Примидон	0,041	0,059	6,4
Карбамазепин	0,015	0,087	32,1
Фенитоин	0,016	0,100	16,5
Карбамазепин-10,11-эпоксид	0,008	0,143	2,3
Стирипентол	0,002	0,045	20,8

Рисунок 2. Анализ ВЭЖХ семи противоэпилептических препаратов и кофеина (наложение хроматограмм шести последовательных анализов) на колонке Agilent ZORBAX SB-C18, 4,6×150 мм, 5 мкм, с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II

Чтобы сократить время анализа стандартов лекарственных препаратов, методика была перенесена на режим УВЭЖХ с использованием колонки Agilent ZORBAX SB-C18, 2,1×50 мм, 1,8 мкм. Простой перенос методики без какой-либо оптимизации по скорости или разрешению позволил сократить время анализа с 40 до 13,5 мин, благодаря чему суммарная экономия времени составила более чем 90%, а экономия растворителя – более чем 66%. На рисунке 3 показано наложение хроматограмм шести последовательных анализов на более короткой колонке вместе со значениями относительного стандартного отклонения (RSD) для времени удерживания и площади пиков, а также значениями разрешения для системы ВЭЖХ 1290 Infinity. Значения RSD для времени удерживания и площади оказались низкими, менее 0,23 и 0,57% соответственно. Кроме того, разрешение было эквивалентным разрешению методики в варианте ВЭЖХ.



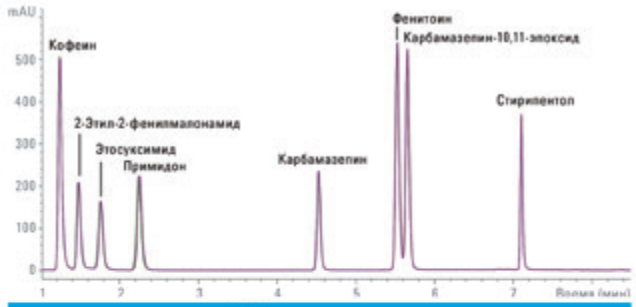
	RSD для времени удерживания (%)	RSD для площади пиков (%)	Разрешение
Кофеин	0,172	0,126	5,6
2-Этил-2-фенилмалонамид	0,077	0,149	3,0
Этосуксимид	0,163	0,142	3,0
Примидон	0,225	0,120	5,1
Карбамазепин	0,091	0,087	25,4
Фенитоин	0,1	0,291	10,2
Карбамазепин-10,11-эпоксид	0,068	0,068	2,2
Стирипентол	0,023	0,560	5,5

Рисунок 3. Анализ методом УВЭЖХ (простой перенос методики) семи противоэпилептических препаратов и кофеина (наложение хроматограмм шести последовательных анализов) на колонке Agilent ZORBAX SB-C18, 2,1×50 мм, 1,8 мкм, с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity

На рисунке 4 показано наложение хроматограмм шести последовательных анализов на более короткой колонке вместе со значениями RSD для времени удерживания и площади пиков, а также значениями разрешения для системы ВЭЖХ 1290 Infinity II. Значения ОСО для ВУ и площади оказались еще немного ниже, менее 0,16 и 0,27% соответственно. Разрешение оказалось эквивалентным исходной методике.

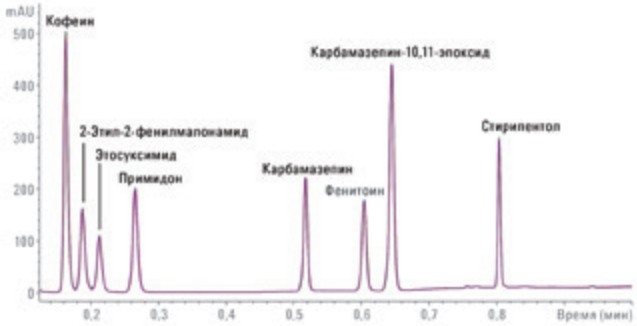
Чтобы достичь сверхскоростного разделения, методику УВЭЖХ оптимизировали по скорости. В результате стало возможным проводить разделение в течение 0,9 мин при скорости потока 1,5 мл/мин. На рисунке 5 показано наложение хроматограмм шести последовательных анализов на колонке диаметром 2,1 мм вместе с характеристиками воспроизводимости времен удерживания и площади пиков, а также значениями разрешения для системы ВЭЖХ 1290 Infinity.

Значения RSD для времен удерживания для шести последовательных анализов составили менее 0,33%. Соответственно значения RSD для площадей пиков составили менее 2,6%. С учетом сокращения времени анализа более чем в 20 раз значения RSD для метода УВЭЖХ оказались достаточно хорошими. Разделение



	RSD для времени удерживания (%)	RSD для площади пиков (%)	Разрешение
Кофеин	0,116	0,082	1,6
2-Этил-2-фенилмалонамид	0,14	0,140	2,8
Этосуксимид	0,134	0,203	3,0
Примидон	0,158	0,091	4,8
Карбамазепин	0,05	0,142	24,4
Фенитоин	0,038	0,145	11,7
Карбамазепин-10,11-эпоксид	0,033	0,119	1,5
Стирипентол	0,009	0,264	4,8

Рисунок 4. Анализ методом УВЭЖХ (простой перенос методики) семи противоэпилептических препаратов и кофеина (наложение хроматограмм шести последовательных анализов) на колонке Agilent ZORBAX SB-C18, 2,1×50 мм, 1,8 мкм, с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II

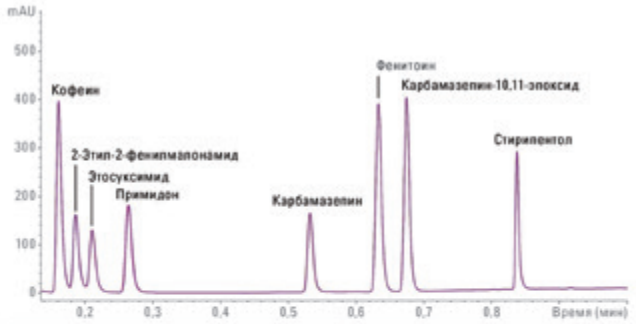


	RSD для времени удерживания (%)	RSD для площади пиков (%)	Разрешение
Кофеин	0,166	0,295	5,3
2-Этил-2-фенилмалонамид	0,302	2,527	2,5
Этосуксимид	0,323	1,459	2,4
Примидон	0,318	0,229	5,0
Карбамазепин	0,057	0,265	25,7
Фенитоин	0,027	0,259	9,3
Карбамазепин-10,11-эпоксид	0,017	0,206	5,0
Стирипентол	0,006	0,527	2,9

Рисунок 5. Анализ методом УВЭЖХ (оптимизированный по скорости) семи противоэпилептических препаратов и кофеина (наложение хроматограмм шести последовательных анализов) на колонке Agilent ZORBAX SB-C18, 2,1×50 мм, 1,8 мкм, с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity

пиков было исключительно хорошим для такого чрезвычайно короткого разделения. Путем повышения температуры колонки до 80 °C удалось даже достичь полного разделения фенитоина и карбамазепин-10,11-эпоксида на уровне базовой линии.

На рисунке 6 показано наложение хроматограмм шести последовательных анализов на колонке диаметром 2,1 мм вместе с характеристиками воспроизводимости времени удерживания и площади пиков, а также значениями разрешения для системы ВЭЖХ 1290 Infinity II. Значения RSD для времени удерживания для шести последовательных анализов составили менее 0,1%, за исключением примидона (0,186%). Соответственно значения RSD для площадей пиков составили менее 0,5%. С учетом сокращения времени анализа более чем в 20 раз значения RSD для методики в варианте УВЭЖХ оказались отличными. Кроме того, разрешение пиков было эквивалентным исходной методике. По сравнению с результатами анализов на системе ВЭЖХ 1290 Infinity полученные результаты были лучше, особенно в отношении воспроизводимости.



	RSD для времени удерживания (%)	RSD для площади пиков (%)	Разрешение
Кофеин	0,045	0,082	1,4
2-Этил-2-фенилмалонамид	0,096	0,137	1,7
Этосуксимид	0,099	0,082	1,5
Примидон	0,186	0,105	3,3
Карбамазепин	0,049	0,489	14,9
Фенитоин	0,017	0,086	6,4
Карбамазепин-10,11-эпоксид	0,013	0,092	2,7
Стирипентол	0,008	0,161	3,4

Рисунок 6. Анализ методом УВЭЖХ (оптимизированный по скорости) семи противоэпилептических препаратов и кофеина (наложение хроматограмм шести последовательных анализов) на колонке Agilent ZORBAX SB-C18, 2,1×50 мм, 1,8 мкм, с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II

Удалось достичь невероятного сокращения времени анализа (с 40 до 2 мин) в сравнении с методикой в варианте ВЭЖХ с использованием колонки размерами 4,6×150 мм с размером частиц сорбента 5 мкм. Благодаря использованию колонки для УВЭЖХ с внутренним диаметром 2,1 мм за счет малой продолжительности анализа удалось на 95% сократить расход растворителя. Кроме того, для анализа было достаточно только четверти всего объема пробы.

Обе системы оценивали на предмет линейности, предела обнаружения (LOD) и предела количественного определения (LOQ). На основе базовых растворов приготовили десять растворов с различными уровнями концентрации (от 50 до 0,195 мкг/мл, разведение 1:2), и установили линейную зависимость между площадью пика и соответствующей концентрацией.

Значения LOD и LOQ определяли как концентрации, обеспечивающие соотношение сигнал – шум (С/Ш) 3:1 и 10:1 соответственно.

В таблицах 1–3 представлены результаты сопоставления систем. Все три методики продемонстрировали на обеих системах высокую линейность с коэффициентом корреляции выше 0,9999 для всех стандартов за исключением стирипентола.

Значения LOD и LOQ улучшились в 10 раз при использовании методики в варианте УВЭЖХ на колонке размерами 2,1×50 мм с размером частиц сорбента 1,8 мкм и более чем в 5 раз при использовании сверхскоростной методики на колонке с внутренним диаметром 2,1 мм в сравнении с методикой ВЭЖХ на длинной колонке с частицами сорбента размером 5 мкм. Оценка чувствительности показала, что на обеих системах для методики ВЭЖХ и оптимизированной по скорости методики УВЭЖХ были получены эквивалентные результаты. После простого переноса методики на систему УВЭЖХ с помощью системы ВЭЖХ 1290 Infinity II чувствительность анализа повысилась.

Таблица 1.

Сравнение линейности и чувствительности двух систем при анализе методом ВЭЖХ

	Линейность		LOD (нг)		LOQ (нг)	
	Agilent 1290 Infinity	**Infinity Agilent 1290 Infinity II**	**Agilent 1290 Infinity**	**Agilent 1290 Infinity II**	**Agilent 1290 Infinity**	**Agilent 1290 Infinity II**
Кофеин	0,99992	1	518,5	585,9	1728,3	1953,0
2-Этил-2-фенилмалонамид	0,99995	1	1251,9	1273,7	4173,1	4245,7
Этосуксимид	0,99996	0,99993	1830,9	1723,2	6103,1	5744,1
Примидон	0,99993	1	626,0	665,8	2086,5	2219,3
Карбамазепин	0,99991	0,99999	1167,1	1220,6	3890,4	4068,8
Фенитоин	0,99990	0,99999	756,0	714,5	2520,2	2381,7
Карбамазепин-10,11-эпоксид	0,99994	0,99999	751,2	837,0	2503,8	2790,0
Стирипентол	0,99961	0,99959	1024,3	1046,3	3414,3	3487,5

Таблица 2.

Сравнение линейности и чувствительности двух систем при анализе методом УВЭЖХ после простого переноса методики

	Линейность		LOD (нг)		LOQ (нг)	
	Agilent 1290 Infinity	**Infinity Agilent 1290 Infinity II**	**Agilent 1290 Infinity**	**Agilent 1290 Infinity II**	**Agilent 1290 Infinity**	**Agilent 1290 Infinity II**
Кофеин	1	0,99999	27,6	15,6	92,1	51,9
2-Этил-2-фенилмалонамид	0,99993	0,9999	97,7	38,5	325,5	128,5
Этосуксимид	0,99997	0,99914	122,1	20,3	406,9	67,8
Примидон	1	1	33,3	19,3	111,0	64,2
Карбамазепин	1	0,99999	54,3	34,9	180,8	116,3
Фенитоин	0,99993	0,99999	30,5	14,6	101,7	48,8
Карбамазепин-10,11-эпоксид	0,99995	1	32,6	15,3	108,5	50,9
Стирипентол	0,99995	0,99993	52,3	25,3	174,4	84,2

Таблица 3.

Сравнение линейности и чувствительности двух систем при сверхскоростном анализе с оптимизацией по скорости

	Линейность		LOD (нг)		LOQ (нг)	
	Agilent 1290 Infinity	**Infinity Agilent 1290 Infinity II**	**Agilent 1290 Infinity**	**Agilent 1290 Infinity II**	**Agilent 1290 Infinity**	**Agilent 1290 Infinity II**
Кофеин	1	0,99999	31,2	45,8	103,9	152,6
2-Этил-2-фенилмалонамид	0,99996	0,99993	114,4	109,3	381,4	364,4
Этосуксимид	0,99994	0,99917	159,7	52,3	532,4	174,4
Примидон	1	1	35,2	43,6	117,4	145,3
Карбамазепин	0,99999	0,99998	72,0	88,9	240,0	296,3
Фенитоин	0,99999	0,99999	25,0	44,9	83,3	149,8
Карбамазепин-10,11-эпоксид	1	1	40,7	45,8	135,6	152,6
Стирипентол	0,99959	0,99948	49,5	47,9	164,9	159,6

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье приведено сравнение результатов анализа стандартов противоэпилептических препаратов с помощью систем ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity и 1290 Infinity II. Методика была перенесена со стандартной колонки для ВЭЖХ (4,6×150 мм, 5 мкм) на колонку для УВЭЖХ (2,1×50 мм, 1,8 мкм). При переносе методики была осуществлена простая коррекция скорости потока, времени анализа и объема пробы. Затем была проведена оптимизация методики УВЭЖХ по скорости, что позволило сократить время анализа до 2 мин. Время анализа существенно сократилось, и объем вводимой пробы снизился на 75%. За счет малого времени анализа расход растворителя сократился на 95%. Результаты анализов, полученные на обеих системах, сравнивали на предмет воспроизводимости, разрешения, линейности и чувствительности. Оценка методик ВЭЖХ и УВЭЖХ выявила в обоих случаях превосходные показатели воспроизводимости, разрешения и линейности, а также сравнимые значения LOD и LOQ. При использовании системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II все примененные методики показали более высокую воспроизводимость времени удерживания и площади пиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Gratzfeld-Huesgen, S. Schneider. Performance Characteristics of the Agilent 1290 Infinity II Multisampler, Agilent Technologies Technical Overview. 2014. Publication number 5991-5348EN.
2. S. Schneider. Performance Characteristics of the Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat, Agilent Technologies Technical Overview. 2015. Publication number 5991-5533EN.
3. H. Darwish, et al. A Stability-Indicating HPLC-DAD Method for Determination of Stiripentol: Development, Validation, Kinetics, Structure Elucidation and Application to Commercial Dosage Form // Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2004. V. 2014. Article ID 638951.
4. U. Huber. Analysis of Antiepileptic drugs by HPLC // Agilent Technologies Application Note. 2001. Publication number 5968-1119EN.
5. S. Schneider. UHPLC Analysis of Antiepileptic Drugs with the Agilent 1290 Infinity II LC // Agilent Technologies Application Note. 2015. Publication number 5991-5733EN.

Agilent Technologies

РАСЧЕТ НЕОПРЕДЕЛЁННОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ В ТИТРОВАНИИ

АВТОРЫ

А. Шайхлисламова,

менеджер по продукту,
Меттлер Толедо СНГ

М. Росслейн,

проф., EMPA, Федеральный научно-исследовательский институт матиалов и науки, Швейцария

АННОТАЦИЯ

Результат любого химического анализа лишен смысла без указания неопределённости проведенного измерения. Поэтому реалистичная оценка неопределённости измерения очень важна для достижения высокого качества анализа в лаборатории. Как оценить этот важный параметр, показано на примере определения концентрации свежеприготовленного раствора гидроксида натрия с использованием гидрофталата калия в качестве первичного стандарта.



Титратор T7 Excellence с автоподатчиком образцов InMotion Pro METTLER TOLEDO

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня многие важные решения принимаются на основании результатов химического анализа. Например, результаты анализа служат основой для определения выходов в процессах химического производства, используются для проверки соответствия материалов заданным характеристикам и для оценки соответствия концентраций тех или иных веществ требованиям законодательства. Принятие таких решений нередко регулирует значительные денежные потоки.

Поэтому лаборатории, в которых получают такие аналитические результаты, просто обязаны принимать соответствующие меры по обеспечению качества выполняемых анализов. Такие меры включают в себя использование сертифицированных аналитических процедур и внутренних процедур обеспечения качества, участие в межлабораторных испытаниях, аккредитацию в соответствии с требованиями стандарта ISO/IEC/EN 17025 (2005) и медицинского технического стандарта ISO 15189 (2007-2008) и обеспечение прослеживаемости результатов измерения.

Цель всех вышеперечисленных процедур заключается в документальном подтверждении качества полученного аналитического результата путем предоставления численной характеристики их надежности и достоверности. В этой связи очень полезно и широко применяется понятие неопределённости измерения (неопределённость результата измерения или просто неопределённость). Эта величина определяется как связанный с результатом измерения параметр, характеризующий диапазон значений, в котором измеряемая величина будет находиться при заданном уровне доверительности.

Хотя понятие неопределённости измерения используется в аналитической химии достаточно давно, общие требования для оценки и представления неопределённости измерения были впервые формально изложены только в 1993 году в Руководстве по представлению неопределённости результатов измерения [1].

Лишь через семь лет вышло в свет руководство Европейского общества по аналитической химии Eurachem/CITAC «Количественное описание неопределённости в аналитических измерениях» [2], содержащее описания более практичных и более соответствующих аналитической химии процедур.

Настоящая статья призвана показать, как эта концепция используется на практике, используя в качестве примера стандартную процедуру титрования.

ЧЕТЫРЕ ОСНОВНЫХ ЭТАПА

Процедура расчета неопределённости измерения для полученного в ходе химического анализа результата включает в себя следующие четыре этапа:

Этап 1: Определение измеряемой величины.

Этап 2: Выявление соответствующих источников неопределённости.

Этап 3: Количественное определение различных вкладов в неопределённости.

Этап 4: Расчет итоговой неопределённости измерения.

Далее показана практическая реализация этих четырех этапов применительно к титрованию на примере определения концентрации свежеприготовленного, не содержащего CO_2 раствора гидроксида натрия (NaOH) с использованием в качестве первичного стандарта гидрофталата калия (KHP). Примерная концентрация NaOH составляет 0,1 моль/л. Эта величина была рассчитана из расхода титрующего раствора вплоть до точки эквивалентности на кривой потенциометрического титрования.

ЭТАП 1: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗМЕРЯЕМОЙ ВЕЛИЧИНЫ

Цель первого этапа состоит в описании проводимой в лаборатории процедуры титрования. Эта информация уже частично содержится в описании стандартной операционной процедуры (SOP) для проведения титрования. В таких описаниях приводятся отдельные этапы аналитических процедур и уравнения для измеряемой величины с указанием всех переменных и параметров, от которых она непосредственно зависит, таких как расход NaOH вплоть до точки эквивалентности.

Процедура титрования

Рассматриваемая процедура титрования состоит из следующих основных этапов (рисунок 1):

1. KHP высушивается в соответствии с рекомендациями поставщика и взвешивается на аналитических весах с ценой деления 0,1 мг.
2. Готовится свежий раствор NaOH концентрации приблизительно 0,1 соблюдением всех необходимых мер для обеспечения отсутствия в нем CO_2.



Рисунок 1. Различные этапы процедуры титрования

3. Взвешенный образец KHP растворяется приблизительно в 50 мл деионизованной воды и титруется приготовленным раствором NaOH. Определяется расход гидроксида натрия вплоть до точки эквивалентности на потенциометрической кривой титрования, записываемой титратором.

Уравнение для измеряемой величины

Уравнение для измеряемой величины, соответствующей концентрации свежеприготовленного раствора гидроксида натрия, имеет следующий вид:

$$C_{NaOH} = 10 \cdot p_{KHP} \cdot m_{KHP}/VEQ \cdot M_{KHP},$$

где C_{NaOH} – измеряемая величина: концентрация гидроксида натрия (NaOH), моль/л; p_{KHP} – чистота используемого стандарта KHP [i], %; m_{KHP} – масса используемого стандарта KHP, г; VEQ – расход NaOH вплоть до точки эквивалентности, мл; M_{KHP} – молярная масса используемого стандарта KHP, г/моль.

ЭТАП 2: ВЫЯВЛЕНИЕ ВСЕХ ИСТОЧНИКОВ НЕОПРЕДЕЛЁННОСТИ

Цель второго этапа состоит в выявлении всех основных источников и в выяснении их влияния на неопределённость определения измеряемой величины. Это один из самых сложных этапов при оценке неопределённости результата измерения. С одной стороны, здесь имеется опасность не учесть важный источник неопределённости, с другой стороны, есть риск учесть эффект других факторов дважды. Удобный способ избежать этих трудностей – построение причинно-следственной диаграммы. Такие диаграммы оказываются очень полезными на практике. Первый шаг в построении диаграммы состоит в изображении четырех параметров, входящих в уравнение для измеряемой величины, в виде основных ветвей (рисунок 2).

Затем каждый этап проводимой аналитической процедуры изучается более тщательно и на диаграмме указываются все выявленные факторы влияния на тот или иной параметр или на измеряемую величину. Двигаясь наружу по каждой из ветвей диаграммы, этот процесс продолжают до тех пор, пока возможные выявляемые эффекты не становятся столь незначительными, что их влиянием на определяемый результат и его неопределённость уже можно пренебречь [3] (рисунок 3).

Чистота первичного стандарта KHP (p_{KHP})

Чистота первичного стандарта KHP указана в каталоге производителя и находится в диапазоне от 99,9% до 100,1%. Если первичный стандарт высушен в соответствии с указаниями производителя, других источников неопределённости здесь не имеется.

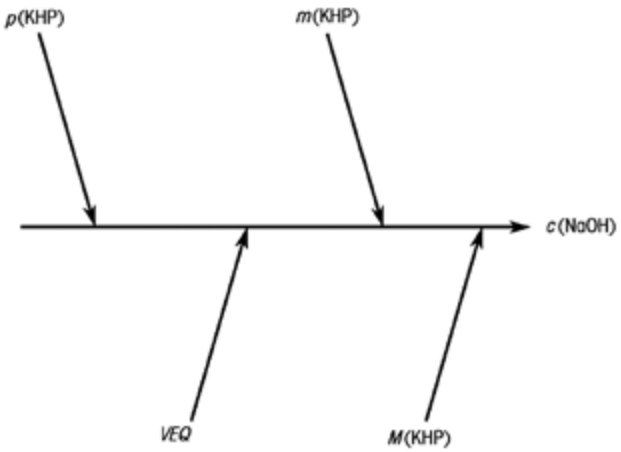


Рисунок 2. Причинно-следственная диаграмма с четырьмя основными ветвями: чистота, масса навески, молярная масса стандарта KHP и расход NaOH вплоть до точки эквивалентности

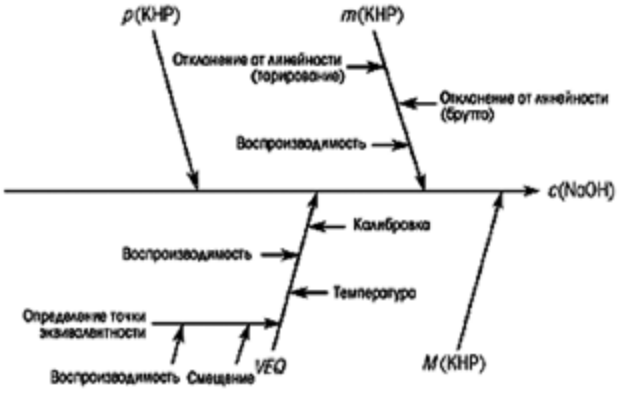


Рисунок 3. Причинно-следственная диаграмма с указанием всех источников неопределённости, которые необходимо учесть

Масса первичного стандарта KHP (m_{KHP})

Масса используемого образца стандарта KHP определяется дифференциальным взвешиванием. Сначала на весы устанавливается пустой стакан и выполняется его тарирование. Затем в стакан добавляется навеска первичного стандарта и определяется вес брутто. Для обоих этих измерений возможное отличие между массой, определяемой используемыми весами, и реальной массой, находящейся на чашке весов, должно быть учтено как источник неопределённости.

Эта разница по терминологии производителя называется линейностью. При использовании дифференциального взвешивания воспроизводимость результата взвешивания можно определять только один раз. Эти три выявленных фактора указываются как источники неопределённости на причинно-следственной диаграмме.

Молярная масса первичного стандарта KHP (M_{KHP})

Неопределённость определения молярной массы KHP может быть найдена из сочетания неопределённостей атомных масс элементов, входящих в соединение. Этот вклад в неопределённость конечного результата пренебрежимо мал по сравнению с другими источниками неопределённости и далее не будет обсуждаться [ii].

Расход NaOH вплоть до точки эквивалентности (VEQ)

Источники неопределённости при определении расхода NaOH вплоть до точки эквивалентности могут быть разбиты на две группы.

В первую группу входят факторы, связанные с волюметрическим добавлением используемого раствора NaOH. Здесь нужно учесть калибровку поршневой бюретки, воспроизводимость дозируемого объема и влияние отличия температуры в лаборатории от температуры, при которой проводилась калибровка поршневой бюретки.

Вторая группа охватывает факторы, связанные с возможностью систематического расхождения или систематической ошибки в определении точки эквивалентности, а также воспроизводимости.

Суммирование вкладов отдельных воспроизводимостей в величину воспроизводимости всего процесса титрования

Наконец, причинно-следственная диаграмма изучается на предмет выявления факторов влияния, которые могут быть скомбинированы в новый источник неопределённости. В рассматриваемом примере имеются только вклады воспроизводимостей для различных параметров. Эти вклады суммируются в один вклад воспроизводимости всего процесса титрования в целом, который указывается как новая основная ветвь на диаграмме (рисунок 4).

ЭТАП 3: КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ НЕОПРЕДЕЛЁННОСТИ

На третьем этапе расчета неопределённости измерения для каждого индивидуального источника, указанного на причинно-следственной диаграмме, определяется численное значение, которое затем пересчитывается в величину стандартного отклонения.

Воспроизводимость титрования (rep)

Вклад воспроизводимости титрования обычно тщательно изучается при разработке новой аналитической процедуры и определяется при сертификации процедуры. В рассматриваемом примере он составляет 0,12%.

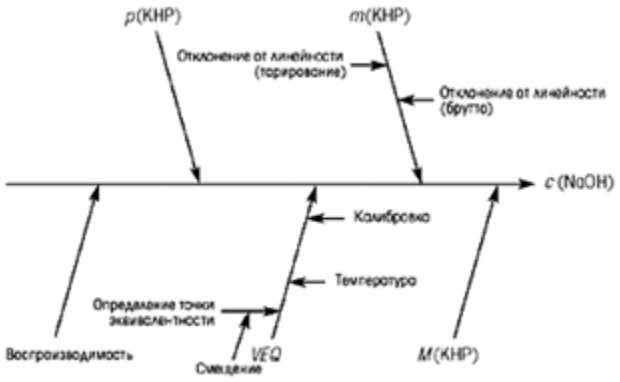


Рисунок 4. Причинно-следственная диаграмма после комбинирования всех вкладов в воспроизводимость и вариабельность всей процедуры титрования [p(KHP)]

Чистота первичного стандарта KHP (p_{KHP})

Производитель KHP указывает чистоту стандарта после высушивания 100% ± 0,1%. Поскольку других деталей производитель не приводит, чистота реактива лучше всего описывается квадратичным распределением. Стандартное отклонение при этом описывается следующим выражением:

$$u(p_{KHP}) = 0{,}1\%/\sqrt{3} = 0{,}058\%.$$

Масса первичного стандарта KHP (m_{KHP})

Согласно сертификату калибровки используемых в данном эксперименте аналитических весов XP205DR отклонение от линейности равно 0,15 мг во всем диапазоне взвешивания. Этот источник неопределённости лучше всего моделируется с использованием функции равномерного распределения. Стандартная неточность массы KHP складывается из стандартных отклонений от линейности двух операций взвешивания – для пустого стакана (тарирование) и для стакана с навеской стандарта (брутто):

$$u(m_{KHP}) = \sqrt{(0{,}15\ мг/\sqrt{3})^2 + (0{,}15\ мг/\sqrt{3})^2} = 0{,}012\ мг.$$

Расход NaOH вплоть до точки эквивалентности (VEQ)

Неопределённость определения расхода NaOH состоит из следующих вкладов:

а) Калибровка

Пределы точности для дозирования объёма воды из бюретки объемом 20 мл составляют ±0,04 мл во всем рабочем диапазоне. Поскольку точность поршневых бюреток при их производстве постоянно контролируется, рекомендуется взять треугольное распреде-

ление. Тогда стандартное отклонение рассчитывается следующим образом:

$$u(VEQ_{KHP}) = 0,04 \text{ мл}/\sqrt{6} = 0,016 \text{ мл}.$$

б) Температура

В международной практике принято проводить калибровку дозирующего оборудования при температуре 20 °C. Поскольку во время титрования температура в лаборатории обычно не равна 20 °C, необходимо принять во внимание неопределённость, связанную с отличием температуры в лаборатории от температуры калибровки. В выражении для корректирующего фактора учитывается только объёмное расширение жидкости (водного раствора), поскольку оно значительно превышает объёмное расширение твердых веществ:

$$u(VEQ_{Temp}) = 19 \text{ мл} \cdot 2,1 \cdot 10^{-4} \ ^{\circ}C^{-1} \cdot 3 \ ^{\circ}C / \sqrt{3} = 0,007 \text{ мл}.$$

в) Систематическая погрешность

Титрование проводится в стакане под подушкой защитного газа, например аргона, чтобы исключить возникновение систематической погрешности, связанной с поглощением растворами CO_2 из воздуха. Главный принцип здесь состоит в том, что такой систематической ошибки лучше не допускать вовсе, чем потом ее компенсировать.

Кроме того, принятие мер по обеспечению качества, таких как регулярное техническое обслуживание и проверка pH-электродов, обеспечивает проведение титрования в соответствии с требованиями процедуры валидации и поэтому защищает от появления систематической погрешности.

Наконец, две стандартные неопределённости, для калибровки и для температурной разницы, суммируются вместе в соответствии с принципом распространения неопределённостей:

$$u(VEQ) = \sqrt{u(VEQ_{Col})^2 + u(VEQ_{Temp})^2} =$$
$$= \sqrt{(0,16 \text{ мл})^2 + (0,007 \text{ мл})^2} = 0,017 \text{ мл}.$$

ЭТАП 4: РАСЧЕТ ИТОГОВОЙ НЕОПРЕДЕЛЁННОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ

Для итогового расчета неопределённости измерения целесообразно объединить все параметры, входящие в уравнение для измеряемой величины, в одну таблицу:

Параметр	Описание	Значение	u(x)	u(x)/x
rep	Воспроизводимость	1,0	0,0012	0,0012
p_{KHP}	Чистота KHP	100,0%	0,58%	0,00058
m_{KHP}	Масса навески KHP	0,3888 г	0,00012 г	0,00031
M_{KHP}	Молярная масса KHP	204,22122 г/моль	0,0038 г/моль	0,000019
VEQ	Расход NaOH	18,64 мл	0,017 мл	0,00091

Концентрация NaOH (измеряемой величины) рассчитывается по указанным в таблице значениям:

$$C_{NaOH} = 10 \cdot P_{KHP} \cdot m_{KHP} / M_{KHP} \cdot VEQ =$$

$$= 10 \cdot 100 \cdot 0,3888/204,2122 \cdot 18,64 = 0,10214 \text{ моль/л}.$$

Затем, используя принцип распространения неопределённостей, рассчитывают общую неопределённость для полученного значения:

$$\frac{u(C_{NaOH})}{C_{NaOH}} = \sqrt{rep^2 + \left(\frac{u(p_{KHP})}{p_{KHP}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{KHP})}{m_{KHP}}\right)^2 + \left(\frac{u(M_{KHP})}{M_{KHP}}\right)^2 + \left(\frac{u(VEQ)}{VEQ}\right)^2} =$$

$$= \sqrt{0,0012^2 + 0,00058^2 + 0,00031^2 + 0,000019^2 + 0,00091^2} =$$

$$= 0,00164.$$

Процентные вклады различных параметров из уравнения для измеряемой величины в общую неопределённость результата измерения показаны на рисунке 5. Диаграмма также показывает, какой вклад оказывается самым большим, и тем самым указывает возможные пути улучшение процедуры титрования.

Для сравнения результата титрования с другим результатом или для проверки нахождения результата

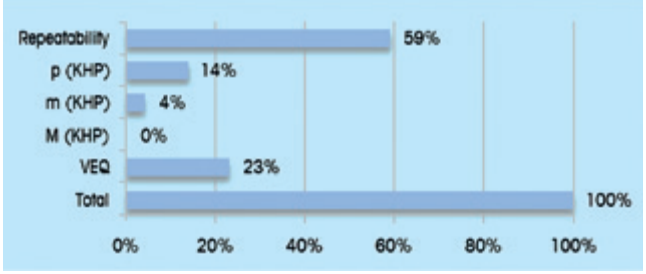


Рисунок 5. Процентные вклады отдельных параметров из уравнения для измеряемой величины в общую неопределённость результата измерения

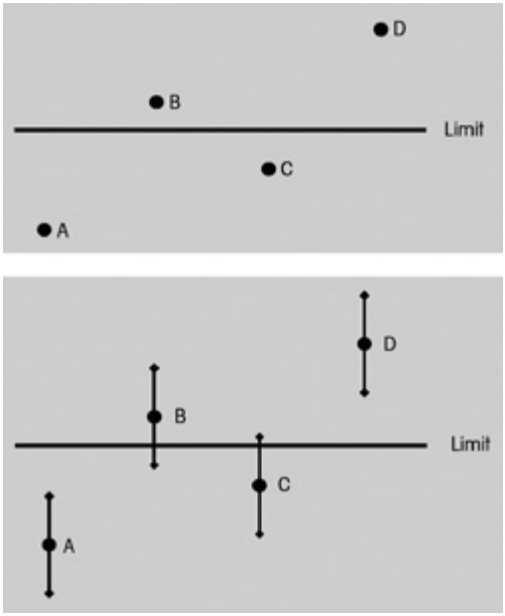


Рисунок 6. Знание неопределённости измерения позволяет проводить оценку результатов титрования. В данном случае результат A явно ниже, а результат D явно выше заданного предела. Для результатов B и C имеется неопределенность и требуется индивидуальный анализ

в заданных пределах, помимо общей стандартной неопределённости измерения, обычно также рассчитывают расширенную неопределённость измерения.

Для этого полученную общую неопределённость измерения умножают на коэффициент покрытия 2, при этом доверительный интервал оказывается равным 95,5%:

$$U_c(C_{NaOH}) = C_{NaOH}\ 1{,}64 \cdot 10^{-3} =$$

$$=0{,}10214 \text{ моль/л} \cdot 1{,}64 \cdot 10^{-3} = 1{,}675 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$$

$$U(C_{NaOH}) = k \cdot 1{,}675 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л} = 3{,}35 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}.$$

Доверительный интервал 95,5%.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ТИТРОВАНИЯ

Для оценки результатов титрования необходимо знать неопределённость измерения и тем самым доверительный интервал. Только при наличии этой информации можно решить, будут ли совпадать результаты титрования одинаковых образцов в разных лабораториях.

Поэтому расчет неопределённости измерения имеет первостепенное значение во многих областях аналитической химии, от контроля технологических процессов до судебной медицины:

- лаборатории в пищевой промышленности и производстве напитков;
- лаборатории в фармацевтической отрасли;
- медицинские аналитические лаборатории;
- лаборатории судебной медицины;
- лаборатории допинг-контроля.

Кроме того, лаборатории, сертифицированные в соответствии с требованиями стандарта ISO/IEC/EN/DIN 17025 (2005), должны быть в состоянии оценить неопределённость измерения для всех выполняемых ими аналитических процедур.

Приведенный вводный пример процедуры титрования показывает, как оценивается неопределённость результата титрования. Он служит только как простое введение и ни в коей мере не претендует на исчерпывающее покрытие этой чрезвычайно широкой и динамично развивающейся области.

ПРИМЕЧАНИЯ

i. Чистота гидрофталата калия в данном контексте относится к функциональному составу соединения, используемого в качестве первичного стандарта, а не к чистоте соединения, как, например, в ВЭЖХ. Здесь подразумевается число кислых протонов в расчете на полное число молекул KHP. Поэтому чистота может составлять более 100%.

ii. Подробное обсуждение процедуры расчета общей стандартной неопределённости для величины молярной массы первичного стандарта можно найти во втором примере публикации QUAM.

ЛИТЕРАТУРА

1. Evaluation of measurement data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM); JCGM 100:2008 (GUM 1993 & 95 with minor corrections). URL: http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html (дата обращения 10.11.2015).
2. Eurachem/CITAC Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (QUAM). 2nd Edition. 2002. URL: http://{0>www.measurementuncertainty.org<}0{> (дата обращения 10.11.2015).
3. S.L.Ellison, V.J. Barwick. Accred. Qual. Assur. 1998. № 3. P. 101–105.

METTLER TOLEDO

АНАЛИЗ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ УФ- И ВИДИМОГО ДИАПАЗОНА

АВТОРЫ

А. Шайхлисламова,

менеджер по продукту,
«Меттлер Толедо СНГ»

Др. Б. Пилс,

менеджер по продукту,
METTLER TOLEDO, Швейцария,
Грайфензее

ВВЕДЕНИЕ

Качественный и количественный анализ образцов ДНК имеет решающее значение в процессах выделения и очистки и в большинстве биологических лабораторий выполняется на UV/VIS-спектрофотометрах. Какую информацию можно извлечь из спектра? В статье описывается, какие спектральные характеристики отвечают за наиболее ценную информацию об образце.

Анализ ДНК обычно проводят сканированием спектра в диапазоне 230–320 нм. Внутри этого диапазона наибольший интерес представляют длины волн 230, 260, 280 и 320 нм (рисунок 1).

ПОГЛОЩЕНИЕ ПРИ ДЛИНЕ ВОЛНЫ 260 НМ

ДНК имеет максимум поглощения при длине волны 260 нм. В чистом образце концентрация ДНК пропорциональна величине поглощения. При измерениях в 10 мм кюветах концентрация двухцепочечной ДНК составляет 50 мг/мл на 1 единицу поглощения с коэффициентом экстинкции 0,020 $(мг/мл)^{-1}$ $см^{-1}$. Концентрация одноцепочечной ДНК соответствует 33 мг/мл на единицу поглощения.

Однако для коротких одноцепочечных олигонуклеотидов требуются более точные величины коэффициентов экстинкции, т.к. поглощение зависит от длины и соотношения азотистых оснований. Наиболее точный результат может быть получен с помощью расчета коэффициента экстинкции индивидуально для каждого олигонуклеотида. Современное программное обеспечение позволяет выполнять автоматический расчет уникальных коэффициентов экстинкции для каждого олигонуклеотида.

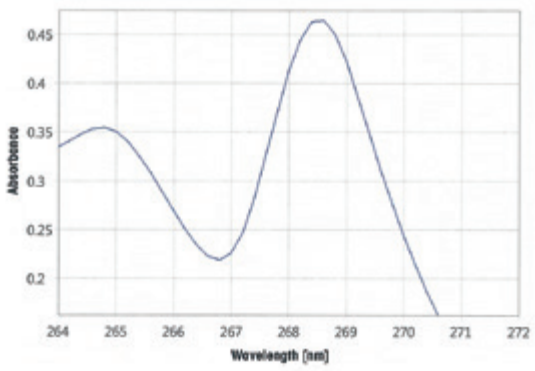


Рисунок 1. **Спектр поглощения ДНК**

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Присутствие примесей в образце, которые характеризуются поглощением на 260 нм, может приводить к значительному завышению концентрации ДНК. В таких случаях применяют коррекцию фона на 320 нм. На этой длине волны чистый образец ДНК не имеет пиков поглощения, поэтому присутствие таких примесей, как фенол или хлороформ, будет характеризоваться появлением пиков в этой области. Для коррекции фона проводится измерение поглощения на 320 нм, которое затем вычитается из поглощения на 260 нм. Это скорректированное значение затем используется для расчета концентрации.

ОТНОШЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ 260/280

Белки имеют максимум поглощения на 280 нм, поэтому для выявления примесей белков анализируют отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм. Отношение ≥1,8 указывает на чистый образец ДНК. Если соотношение меньше, образец может быть загрязнен белком. Использование коррекции фона на 320 нм поможет компенсировать присутствие белка, так же как и при определении концентрации на 260 нм.

ОТНОШЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ 260/230

Дополнительная информация о чистоте ДНК может быть получена из соотношения поглощения на длинах волн 260 и 230 нм. Среди примесей, которые характеризуются поглощением на 230 нм, можно назвать органические соединения и хаотропные агенты, такие как мочевина, гуанидин, ЭДТА, углеводы и феноляты. Для чистого образца ДНК отношение $A_{260/230}$ должно быть больше 1,8.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессах выделения и очистки крайне важно знать точную величину концентрации и степень чистоты вашего образца ДНК. Использование низкокачественной ДНК или неверной концентрации может привести к некорректным результатам, а значит, и повторению всего анализа.

UV/VIS-анализ ДНК с использованием спектрофотометра UV5Nano – это простой, быстрый и экономичный метод, позволяющий получить качественную и количественную информацию об образце (рисунок 2). Предустановленные методики анализа концентрации и чистоты ДНК можно использовать для быстрого и простого запуска метода, они гарантируют получение точных результатов.



Рисунок 2. **Спектрофотометр UV5Nano Excellence METTLER TOLEDO**

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОГО АНАЛИЗАТОРА SKALAR SAN++

АВТОР

Эндрю Вильямс (Andrew Williams),

региональный менеджер Skalar
(Центральная, Восточная Европа,
Россия и страны СНГ)

Перевод: М.А. Брыкина,

менеджер по продвижению
ГК «Фармконтракт»

ВВЕДЕНИЕ

Согласно требованиям Фармакопеи США (USP) и Европейской Фармакопеи (EuPh) при исследовании очищенной воды, воды для инъекций (WFI) и валидации очистки необходимо проведение анализа общего содержания органического углерода (TOC).

Управление по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов (FDA) также расценивает анализ TOC как надлежащий метод валидации очистки. На сегодняшний день множество фармацевтических компаний используют анализ TOC вместо других традиционных методов, что обусловлено его простотой, точностью определения остаточных количеств органических загрязнителей, быстрым откликом и экономической эффективностью.

Специально для автоматизации процесса анализа TOC на основе USP (издание 26, метод <643>) и EuPh (метод 2.2.44) компания Skalar предлагает автоматический проточный анализатор SAN++ с «мокрым» разложением пробы.



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ПРОТОЧНЫЙ АНАЛИЗАТОР SKALAR SAN+++

Анализатор SAN++ состоит из автосэмплера для автоматического отбора проб и химического модуля TOC, позволяющего проводить химическое окисление (раствором персульфата), УФ-облучение, обнаружение по ИК-излучению и обработку данных.

Образцы воды вводятся в анализатор SAN++ с помощью автосэмплера Skalar SA1074. Во избежание контаминации из лабораторной среды образцы анализируются из сертифицированных виал EPA/VOA TOC.

После ввода проб образец химически окисляют для удаления неорганического углерода. Затем образец смешивают с персульфатом калия и вводят в кварцевую спираль, где его подвергают УФ-облучению. Органический углерод в образце превращается в карбонат. После повышения кислотности и барботирования определяется общее содержание органического углерода TOC в виде двуокиси углерода (CO_2) с помощью бездисперсионного ИК-детектора. Проточный анализатор SAN++ в данной конфигурации выдал результаты, соответствующие требованиям USP/EuPh (таблица 1).



Использование других дополнительных картриджей для анализатора Skalar SAN++ позволяет расширить диапазон анализируемых параметров, что еще больше увеличивает гибкость его применения в фармацевтической отрасли. Пример конфигурации представлен на рисунке 1.

Таблица 1.

Результаты анализа TOC с помощью проточного анализатора Skalar SAN++

Параметры	Данные Skalar	Критерии USP/EuPh
Проверка пригодности системы 1,4-Бензохинон Сахароза	 99–100% 99–100%	 85–115% 85–115%
Линейность (50-100 мкг С/л)	0,99948	0,9950–1,0000
Предел обнаружения метода	9 мкг С/л	меньше 50 мкг С/л



Многофункциональное программное обеспечение сбора данных FlowAccess® для управления анализатором SAN++ полностью соответствует требованиям современной фармацевтической лаборатории, включая защиту информации от несанкционированного доступа согласно FDA 21 CFR part 11, стандартную операционную процедуру (SOP) и валидационные протоколы IQ/OQ/PQ.

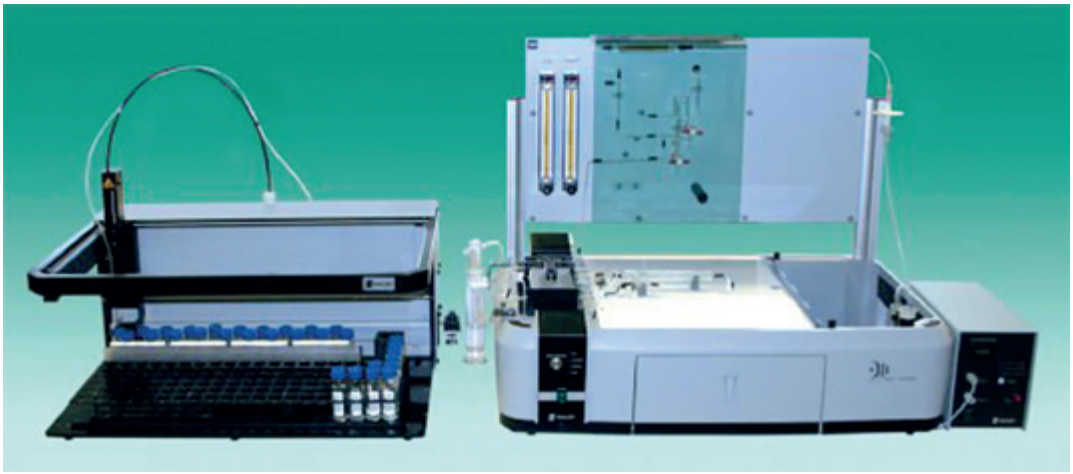


Рисунок 1. Конфигурация анализатора Skalar SAN++

ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОБОРУДОВАНИЯ BÜCHIGLASUSTER

ПЕРЕВОД:

О.В. Новожилов,

главный технолог ГК «Фармконтракт»,
к.х.н.

АННОТАЦИЯ

Synthena AG – это молодая и динамично развивающаяся биотехнологическая компания, основанная в 2012 году как дочернее предприятие Бернского университета. Компания специализируется на разработке и организации серийного производства новых жизненно важных лекарственных препаратов на основе модуляции РНК, предназначенных для лечения тяжелых нервно-мышечных заболеваний. Запатентованная технологическая платформа трицикло-ДНК предлагает широкие преимущества по сравнению с современной химией олигонуклеотидов для новой стратегии РНК-вмешательства, сходной с переключением сплайсинга и другими антисмысловыми подходами. Наиболее перспективная программа доклинической разработки препаратов посвящена мышечной дистрофии Дюшенна, наследственному заболеванию, которое возникает у мальчиков (1:3500) и приводит к смерти в старшем юношеском возрасте.





ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ЗАДАЧИ И ТРЕБОВАНИЯ

Для решения задач масштабирования синтеза модифицированных нуклеотидов компании Synthena была необходима реакторная система среднего масштаба. Поскольку это многостадийный процесс, включающий различные реакции, требовалась система, способная работать как при низких температурах (до –60 °C), так и в режиме кипячения органических растворителей (до +100 °C).

Систему планировалось применять для масштабирования – от объёма лабораторной колбы до максимальных объёмов, которые можно было реализовать с соблюдением правил техники безопасности и экологических норм в условиях компании, базирующейся в университете. Таким образом, максимальный объём 15 л являлся в некоторой степени компромиссом, поскольку в реакторе можно было проводить масштабирование, начиная с объёма 3 л.



Так как пространство в лаборатории ограничено, реактор должен был быть компактным и мобильным, чтобы система местной вентиляции при необходимости могла использоваться для другого оборудования.

Установку планировалось применять для работы под атмосферным давлением, а также эпизодически для дистилляции под вакуумом. Были необходимы системы дозирования жидких и твёрдых реагентов. Также важным требованием была возможность быстрой очистки реактора, поскольку работать на нём планировалось с различными средами.

НАДЕЖНЫЕ И ПРОВЕРЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ BÜCHIGLASUSTER

Компания Synthena AG изучила различные предложения рынка и остановила свой выбор на оборудовании BüchiGlasUster, отличающемся высоким качеством и полностью отвечающем условиям процесса. Кроме того, для Synthena AG имело большое значение наличие и доступность запасных частей на складе.

Для начала исследований Synthena AG приобрела у BüchiGlasUster два 15-литровых реактора MiniPilot и нутч-фильтр объемом 30 л. Данное оборудование применялось для многостадийных синтезов, включающих окислительно-восстановительные процессы, металлирование, нуклеозидирование и различные манипуляции с защитными группами.

Возможность быстрой сборки и разборки оборудования обеспечили особенности гибких соединений BüchiFlex, позволяющие произвести быструю и простую сборку стеклянных модульных систем. При этом уплотнения из PTFE гарантируют прочность и химическую инертность соединений.

КОМПЛЕКСНОЕ РЕШЕНИЕ BÜCHIGLASUSTER

В данном проекте компания BüchiGlasUster полностью выполнила разработку, инжиниринг, запуск и сервисное обслуживание, предоставив Synthena AG комплексное решение. Это имеет очень большое значение, особенно для компании, находящейся на этапе start-up, такой как Synthena AG. Теперь специалисты смогут полностью сосредоточиться на своей основной деятельности – научных исследованиях.

Профессиональное сервисное обслуживание BüchiGlasUster на всех этапах проекта и детальная документация с описанием оборудования полностью оправдали ожидания Synthena AG, что, несомненно, станет основой для продолжительного сотрудничества в будущем.



РЕКОМЕНДАЦИИ ПО УДАЛЕНИЮ ЖИДКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОТХОДОВ ОТ INTEGRA

ПЕРЕВОД:

М.А. Брыкина,

менеджер по продвижению
ГК «Фармконтракт»

АННОТАЦИЯ

Компания Integra Biosciences с 1965 года проектирует и производит высокотехнологичное оборудование и приборы для автоматизации рутинных процессов: устройства для отбора проб, приборы для стерилизации, приготовления и розлива жидких сред и др. Безукоризненный сервис и высокое качество продукции Integra – это визитная карточка швейцарского производителя. Широкая линейка продукции компании, особенно устройства с системой автоматизации, востребованы во всем мире.

На территории Российской Федерации дистрибьютором продукции Integra является Группа компаний «Фармконтракт».

ВВЕДЕНИЕ



Основные принципы обеспечения биологической безопасности при работе с инфекционными микроорганизмами и лабораторными животными были сформулированы Государственным центром санитарно-эпидемиологического надзора США (CDC). Было выделено 4 уровня биологической безопасности (УББ), каждый из которых состоит из первичных и вторичных барьеров и особенностей микробиологических процедур. Первый уровень (УББ-1) соответствует минимальному риску инфицирования, а четвертый (УББ-4) предназначен для работы с микроорганизмами, которые вызывают угрожающие жизни или не поддающиеся лечению инфекции.

Специально для лабораторий 1, 2 и 3 уровня биологической безопасности компания Integra разработала лабораторную аспирационную систему VACUSAFE, обеспечивающую простое, надежное и безопасное аспирирование опасных отходов. Система полностью соответствует требованиям инструкций по технике безопасности микробиологических и биомедицинских лабораторий по обращению с загрязненными жидкостями и обеспечивает максимальную производительность и минимальный уровень шума.

Ниже представлены рекомендации специалистов INTEGRA по удалению жидких биологических отходов с использованием приборов INTEGRA.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Соберите и изучите всю информацию о требованиях по обращению с жидкими биологическими отходами

Соберите всю необходимую информацию касательно обращения с биологическими отходами, приведенную в государственных нормативах в области охраны окружающей среды и требованиях по технике безопасности (санитарно-эпидемиологические правила и нормативы). Обращайтесь с отходами с тем же вниманием и осторожностью, как если бы вы работали с биологически опасными веществами. При необходимости обратитесь к опытному и уполномоченному специалисту (ответственному за биологическую безопасность).

Ответственность за удаление биологических отходов лежит на производителе отходов. Поэтому Вашей обязанностью является обеспечение надлежащего устранения биологических отходов для защиты здоровья населения и окружающей среды от потенциального источника опасности.

2. СОРТИРОВКА ОТХОДОВ

Используйте отдельные контейнеры для каждой категории отходов

Сортировка отходов – это ключ к эффективной организации сбора и удаления отходов. Организуйте Ваш сбор и удаление отходов в соответствии с различными категориями жидких отходов: например, биологические, химические, радиоактивные, содержащие ткани человеческого/животного происхождения.

Надлежащая сортировка отходов способствует снижению объемов опасных отходов, минимизирует риски, связанные с их обращением, транспортировкой и хранением, а также снижает стоимость организации сбора и обращения с отходами.

3. БЕЗОПАСНАЯ ПОДАЧА ЖИДКОСТИ

Защитите себя и окружающих посредством использования подходящих инструментов

Вакуумные системы широко используются для аспирирования и отбора жидких биологических отходов перед удалением. Используйте гидрофобный фильтр либо отделитель жидкости и сигнализатор предельного уровня жидкости для защиты насоса от перелива жидкости. Избегайте образования аэрозольной взвеси и каплеобразования, используя устройства аспирации, подходящие к лабораторной посуде, из которой проводится аспирирование, например пробирки, сосуды, колбы, флаконы, Т-колбы и луночные планшеты.

Каждый перенос и манипулирование с биологически опасными жидкостями сопряжен с риском для оператора. Чтобы свести риск к минимуму избегайте возникновения капельной протечки, проливания и образования аэрозолей.



4. ПОЛНАЯ ГЕРМЕТИЗАЦИЯ

Используйте ударопрочные емкости для сбора и хранения

Убедитесь, что устранен риск перетекания через край, выплескивания и поломки емкости для сбора отходов. Не наполняйте емкости для сбора отходов больше чем на 75% от их общего объема. Транспортируйте отходы в ударопрочных контейнерах. Если жидкие отходы хранятся в стеклянной бутылке, используйте пластиковый контейнер для ее транспортировки в зону утилизации отходов.

При сборе отходов реагенты внутри емкости могут вступить во взаимодействие с образованием газа и повышением давления. Так как сжимаемость у воздуха намного лучше чем у жидкостей, наличие внутри емкости воздуха объемом 25% от общего позволяет избежать риска взрыва. Использование ударопрочных контейнеров предотвращает вытекание опасных жидкостей в случае падения.

5. МАРКИРОВКА

Корректно маркируйте лабораторные субстанции

Корректная маркировка должна включать информацию о категории отходов с соответствующими значками, указание названия активного или опасного вещества, данные о местоположении, Ф.И.О. ответст-

венного лица и дату. Рекомендуется регулярное прохождение обучения методам корректной маркировки.

Корректная маркировка субстанций важна для информирования других сотрудников о потенциальной опасности. Она также помогает сократить время реагирования аварийных служб в случае чрезвычайной ситуации.

6. ДЕАКТИВАЦИЯ

Выберите подходящий метод деактивации

Важно деактивировать биологические субстанции перед последующей обработкой и утилизацией. Выберите метод деактивации, соответствующий природе биологического вещества и уровню биологической безопасности. Должно быть обеспечено строгое соблюдение требований государственных нормативов. Оцените совместимость метода с другими веществами, присутствующими в жидких отходах. Перед проведением деактивации проверьте также совместимость с используемыми приборами и материалами.

Преобразование активных субстанций в нейтральные способствует уменьшению степени биологической опасности. Это также поможет снизить объем специальных отходов, которые должны быть переданы третьим лицам для специальной утилизации.

7. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

Сточные воды
или специальные жидкие отходы?

Установите классификацию для инактивируемых биологических веществ и присутствие других опасных веществ. В соответствии с государственными нормативами определите, попадает ли ваша жидкость в категорию сточных вод или специальных жидких отходов. Избегайте накопления большого количества отходов, удаляйте жидкие отходы на регулярной основе.

Снизьте потенциальный риск и избегайте ненадлежащего обращения с жидкими отходами. Это позволит избежать излишне высоких затрат на их удаление.

СИСТЕМА VACUSAFE – УСТРОЙСТВО ДЛЯ ВАКУУМНОЙ АСПИРАЦИИ ЖИДКОСТЕЙ

Аспирация в максимально комфортных условиях: включите – выберите нужный режим – начинайте работать.

Особенностями системы VACUSAFE являются:

1. Встроенный вакуумный насос с тонкой регулировкой вакуума и минимальным уровнем шума. Встроенный гидрофобный фильтр защищает насос от попадания жидкости внутрь конструкции.



2. Бутыль из высокопрочного (небьющегося) стекла.
3. Подставка для надежного размещения бутылки.
4. Все компоненты, контактирующие с образцом, автоклавируются.
5. Автоматически закрывающиеся коннекторы обеспечивают защиту от потерь капель жидкости в момент отсоединения бутыли или шлангов.
6. Датчик уровня жидкости в бутыли (защита от переливания жидкости).
7. Благодаря большому количеству насадок отбор жидкости становится возможным из тары любой формы и объема.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОДУКТАХ

Снижение времени анализа летучих органических соединений до 4 мин

ПЕРЕВОД:

Г.В. Казыдуб,

руководитель отдела
аналитического оборудования
ООО «Фармконтракт»

ВВЕДЕНИЕ

Фармацевтическое производство строго регулируется. Американская и Европейская фармакопеи постулируют следующий принцип: фармацевтические продукты должны быть проанализированы на содержание остаточных органических растворителей. Предпочтительная технология для решения этой задачи – парофазный анализ методом газовой хроматографии (ГХ).

Обычный ГХ-метод, применяемый для анализа остаточных органических растворителей, по требованиям Европейской фармакопеи предусматривает 35-минутный хроматографический прогон. Научно-исследовательский отдел компании Pfizer в г. Сэндвич (Великобритания), заинтересовавшись возможностью ускорения анализа, обратился за консультацией в Research Institute for Chromatography (Исследовательский институт хроматографии, ИИХ) к профессору Пату Сандре. Результаты совместной работы были опубликованы в статье (J.Sep.Sci. 2006, 29, 695–698), где отражено существенное сокращение времени анализа.

Для анализа остаточных органических растворителей Pfizer использовал газовый хроматограф модели 6890 Agilent Technologies, укомплектованный инжектором с делением / без деления потока и пламенно-ионизационным детектором. В приборе была установлена капиллярная колонка DB-624 длиной 30 м, с внутренним диаметром 320 мкм и толщиной пленки фазы 1 мкм. Эта колонка соответствует требованиям Европейской и Американской фармакопей, показывая хорошее разделение как полярных, так и неполярных растворителей. Сам анализ занимает около 35 мин без учета времени, затрачиваемого на охлаждение термостата, что добавляет порядка 5–10 мин в зависимости от температуры окружающего воздуха в лаборатории.

Целью всей процедуры было сокращение общего времени анализа, увеличение производительности и пропускной способности с сохранением основных параметров метода.



Рисунок 1. Gerstel MPS с интегрированной опцией взвешивания

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

МОДУЛЬНЫЙ НАГРЕВАТЕЛЬ КОЛОНОК

Специалисты ИИХ дополнили ГХ Agilent 6890 устройством MACH (модульный нагреватель колонок ускоренный) производства компании Gerstel. Это устройство допускает монтаж до 4 модулей для стандартных колонок на газовый хроматограф. Скорость нагрева может достигать 1800 °C/мин. Охлаждение от 240 до 40 °C достигается за время от 30 до 60 с в зависимости от длины колонки.

В основу MACH заложена технология «малой термической массы», нагревающей только хроматографическую колонку. В отличие от стандартных хроматографических термостатов в модулях MACH не используются большие количества изоляции, металлические камеры, а также большие объемы воздуха – все то, что должно быть нагрето и охлаждено по температурной программе метода. Поскольку технология MACH не требует нагревания всех перечисленных выше вспомогательных элементов, достигается значительное сокращение времени хроматографического анализа и увеличение производительности. Модуль управляется ПО Agilent ChemStation или напрямую из ПО MAESTRO.

МОДЕРНИЗАЦИЯ ГХ МЕНЕЕ ЧЕМ ЗА ПОЛЧАСА

Модернизация прибора Agilent 6890 включала замену стандартной двери термостата на систему MACH, вмещающую до 4 модулей. Примерно через 30 мин система MACH была установлена, а сам газовый хроматограф переконфигурирован и готов к работе. Колоночные модули были смонтированы снаружи ГХ напротив соответствующих отверстий в двери термостата MACH. Во время анализа термостат ГХ находился в изотермическом режиме при высокой температуре. Это сделало возможным обогрев концевиков колонок и крепежа без дополнительных приспособлений, уменьшив общую сложность системы. Отсутствие необходимости циклического нагрева термостата ГХ способствует экономии электроэнергии. Не выделяется тепловая энергия при повторных нагревах термостата до высоких температур. Это, в свою очередь, означает, что меньшее количество тепла выделяется в атмосферу лаборатории, а следовательно, меньше электроэнергии затрачивается на кондиционирование помещения летом.

Для решения поставленной задачи ИИХ выбрал модуль MACH с колонкой, которая была короче и имела меньший внутренний диаметр, чем использовавшаяся в исходном методе колонка компании Pfizer: DB-624, длина 25 м, внутренний диаметр 180 мкм и толщина пленки фазы 1 мкм. Эта колонка показывает большую эффективность на единицу длины, а также большую скорость разделения. Улучшения значительны: разделение модельной смеси из 20 растворителей происходит за время 2,7 мин с нужными уровнями чувствительности, воспроизводимости и линейности в широком диапазоне концентраций. Благодаря высокоэффективному охлаждению общее время цикла было снижено до 4 мин. Дополнительно показаны относительные стандартные отклонения для площадей пиков, полученных при вколе тестовой смеси (6 мкг/мл, число повторов 6, % относительного стандартного отклонения для площадей пиков). Пределы обнаружения (%) указаны в соответствии с отношением сигнал/шум = 3 в дополнение к показателю линейности r^2, полученному для трехточечной калибровки 6, 25 и 100 мкг/мл (таблица 1).

Стандартные емкости автосамплера помещаются на весы. Жидкие образцы, стандарты, реактивы и растворители автоматически добавляются и взвешиваются, полученные значения регистрируются отдельно. Для каждого образца могут быть заданы последовательные добавки в ПО MAESTRO. Результаты автоматически переносятся в заранее определенные формы Microsoft Excel для обработки. Каждый образец отражается в отдельной строке, каждое разбавление – в отдельной колонке.

После того как все операции по пробоподготовке будут завершены, автосамплер может ввести полученный образец в ГХ- или ЖХ-систему.

Каждый шаг, от пробоподготовки до ввода образца, может быть удобно и эффективно запрограммирован в ПО MAESTRO. При совмещении с ПО Agilent ChemStation общий метод и общая таблица последовательностей управляет всеми шагами, от пробоподготовки до ввода образца в ГХ/МС- или ЖХ/МС-систему. Опция взвешивания MPS упрощает лабораторные операции, а также процессы обработки данных, снижая риск ошибки оператора, повышая удобство, производительность и точность.

Таблица 1.

Перечень растворителей с временами удерживания (мин), стандартными отклонениями и относительными стандартными отклонениями (%) в зависимости от времен удерживания

	Время удерживания (мин)			Площадь	LOD	Коэф. корр
	Знач.	SD	RSD (%)	RSD (%)	% (w/w)	r^2
Метанол	0,888	0,0005	0,055	2,85	0,0060	0,9960
Пентан	1,054	0,0005	0,051	0,77	0,0001	0,9993
Этанол	1,085	0,0000	0,000	3,90	0,0041	0,9976
Диэтиловый эфир	1,110	0,0000	0,000	1,25	0,0002	0,9998
Ацетон	1,180	0,0004	0,032	2,28	0,0005	0,9948
Изопропанол	1,213	0,0004	0,031	4,93	0,0036	0,9991
Ацетонитрил	1,246	0,0004	0,030	3,30	0,0028	0,9994
Дихлорметан	1,284	0,0005	0,038	3,50	0,0022	0,9984
т-Бутанол	1,303	0,0000	0,000	5,18	0,0028	0,9980
Гексан	1,402	0,0005	0,038	1,47	0,0002	0,9999
н-Пропанол	1,444	0,0004	0,026	4,68	0,0082	0,9990
Этилацетат	1,549	0,0000	0,000	2,93	0,0016	0,9995
Хлороформ	1,603	0,0004	0,024	3,81	0,0110	0,9997
Циклогексан	1,661	0,0005	0,029	1,71	0,0003	0,9993
Бензол	1,713	0,0000	0,000	2,73	0,0007	0,9998
н-Бутанол	1,785	0,0007	0,039	5,41	0,0237	0,9972
1,4-Диоксан	1,874	0,0005	0,026	7,70	0,0033	0.9904
4-Метил-2-пентанон	1,985	0,0004	0,019	8,21	0,0031	0,9985
Толуол	2,028	0,0000	0,000	3,10	0,0014	0,9995
н-Бутилацетат	2,130	0,0004	0,018	7,03	0,0044	0,9974

РАБОТА АВТОСАМПЛЕРА GERSTEL MPS В ЛАБОРАТОРИИ КОМПАНИИ SCHÜLKE & MAYR В НОЧНУЮ СМЕНУ

ПЕРЕВОД:

Г.В. Казыдуб,

руководитель отдела
аналитического оборудования
ООО «Фармконтракт»

АННОТАЦИЯ

Schülke & Mayr производят и продают дезинфектанты, антисептики, биоциды, продукты для медицинского обеззараживания кожи, активные компоненты для дезодорантов, а также моющие средства. Среди их заказчиков – больницы и медицинские центры, а также фармацевтические, косметические и пищевые компании.

ВВЕДЕНИЕ

Аналитический контроль качества фармацевтической продукции регулируется строгими нормативами. Количество ингредиентов, стандартов и растворителей должно быть точно определено. Должны быть проведены тесты стабильности, сами методы – валидированы. Производительность аналитических приборов должна быть подтверждена и сертифицирована, а замена расходных материалов и техническое обслуживание – запланированы на регулярной основе. Ключевым элементом программы контроля качества аналитических процедур немецкой фармацевтической компании Schülke & Mayr является многофункциональный самплер Gerstel MPS с интегрированной опцией взвешивания.



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Поскольку основная масса продуктов Schülke & Mayr используется в медицинских, клинических или фармацевтических целях, компания официально классифицируется как фармацевтическая. Требования для получения и поддержания этой классификации заключаются в соответствии следующим нормам:

- GMP – надлежащая производственная практика;
- AMG – немецкий закон о медицинской продукции;
- немецкое руководство по производству фармацевтических и активных ингредиентов;
- руководство Европейского союза (ЕС) по GMP;
- руководство ЕС 1223/2009 (косметическая продукция);
- руководство ЕС 528/2012 (биоциды).

Эти нормативные документы определяют строгий входной контроль сырья, непрерывный мониторинг полупродуктов и измерения концентрации активных компонентов в готовом продукте. Готовые формы регулярно подвергаются тестам на стабильность для подтверждения отсутствия существенных изменений безопасности и эффективности по мере старения. Нормативы также предписывают регулярную поверку и валидацию измерительного и испытательного оборудования.

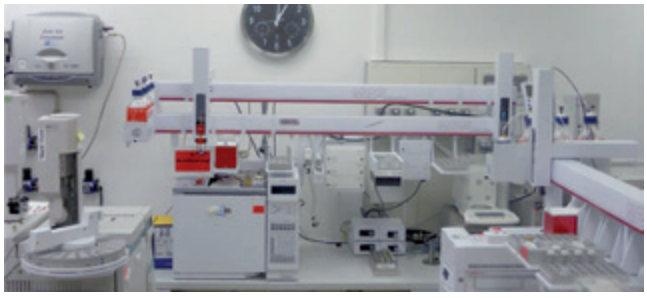
КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НЕВОЗМОЖЕН БЕЗ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО АНАЛИЗА

Schülke & Mayr проводят все аналитические процедуры на своей базе. Аналитические системы, используемые для этой работы, – газовые хроматографы (ГХ) и высокоэффективные жидкостные хроматографы (ВЭЖХ). Аналитические методы разрабатываются в лаборатории контроля качества компании и валидируются в соответствии с нормативными документами. Schülke & Mayr приходится анализировать порядка 40 тыс. образцов в год, 90% из которых приходится на ГХ и ВЭЖХ. Автосамплер Gerstel MPS проводит автоматизированную пробоподготовку более 10 тыс образцов в год. Количество образцов за последние годы значительно возросло. В отличие от возросшего количества образцов количество сотрудников в обозримом будущем не изменится. Для увеличения производительности лаборатории и соблюдения строгих стандартов без увеличения штата всерьез рассматривалась возможность работы в ночную смену. Дополнительная смена, безусловно, повысила бы уровень загрузки лабораторного оборудования и производительность, но работа по ночам виделась многим сотрудникам как крайне непривлекательный вариант и дополнительная тягота. После рассмотрения альтернативных вариантов был выбран более привлекательный способ: повысить уровень автоматизации в лаборатории. В настоящее время в ночную смену работает автосамплер Gerstel MPS.

НАДЕЖНЫЙ АНАЛИЗ НЕВОЗМОЖЕН БЕЗ ПРЕЦИЗИОННОГО ВЗВЕШИВАНИЯ

Анализ большого числа образцов ночью без необходимости присутствия сотрудников с целью пробоподготовки, создания стандартов, а также мониторинга всего процесса – это не просто хорошая идея в теории, это действенный инструмент на практике. Однако для обеспечения надежности внедрения значительного количества автоматизации необходимо выполнение одного условия: такая автоматизированная система должна включать интегрированные весы. Они необходимы не только для взвешивания образцов, но и для приготовления растворов стандартов и реагентов, а также серий разбавлений для калибровки и контроля качества измерений. В настоящее время Schülke & Mayr заменили использование стандартных пипеток на прецизионное дозирование жидкостей при помощи Gerstel MPS с автоматизированной опцией взвешивания. При этом точность 1000 мкл шприца составляет более чем 99,5% со стандартным отклонением менее чем 0,2%. Это значит, что MPS осуществляет более точные процедуры, чем человек с ручной пипеткой.

При подготовке плана реструктуризации лаборатории, который был сфокусирован на усилении автоматизации процессов, сотрудники лаборатории попытались найти автосамплер с интегрированной опцией взвешивания. Прибором, удовлетворяющим указанным требованиям, стал автосамплер Gerstel MPS в версии DualHead, которая допускает использование двух разных по объему шприцев, что подразумевает дозирование жидкостей в широком диапазоне точно и эффективно, без дополнительных временных затрат на смену шприца. Опция взвешивания MPS предлагает возможность контро-



ля, мониторинга и документирования дозированных количеств. Кроме того, MPS также производит все стандартные шаги по пробоподготовке для ГХ и ВЭЖХ, а также ввод пробы в хроматографическую систему.

СБАЛАНСИРОВАННЫЙ ВЫБОР ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ

В работе лаборатории задействованы несколько систем MPS. Первый MPS в варианте самостоятельной рабочей станции используется для добавления внутренних стандартов и построения серий разбавлений. XL-версия автосамплера MPS, названная «мост», проводит пробоподготовку для двух ГХ. Эти процедуры состоят из введения пробы в ГХ, расположенный слева, и перемещения виалы с подготовленным образцом в стандартный автосамплер ГХ, расположенного справа. Третий MPS смонтирован на другой ГХ-системе. Каждый из автосамплеров оснащен опцией взвешивания. Сама процедура осуществляется на лабораторных весах Sartorius ME235S OCS. Термостатируемые держатели виал используются для хранения стандартов и растворов реактивов при постоянной температуре 20 °C. Каждый из автосамплеров оснащен двумя держателями шприцев (Dual Head Version), что делает возможным одновременное использование шприцев двух разных объемов. Операция взвешивания может быть выбрана в разделе PrepSequence в программном обеспечении (ПО) Gerstel MAESTRO. Итоговый протокол взвешивания может быть экспортирован в файл формата MS Excel или .csv для последующей обработки в системе LIMS или системе обработки хроматографических данных.

MPS с опцией взвешивания обеспечивает более эффективную работу и производительность. Он позволяет проводить анализы ночью, без контроля со стороны персонала. Когда сотрудники приходят на работу утром, они быстро разбирают полученные ночью результаты и дают разрешение на выпуск партий готовой продукции. Это приводит к снижению времени ожидания на производстве, что, безусловно, немаловажно. На случай выхода из строя систем автоматизации сотрудники паралельно проходят обучение и могут проводить все процедуры пробоподготовки вручную.

МОНИТОРИНГ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ ПРИБОРОВ – НЕОБХОДИМОСТЬ И ПОТРЕБНОСТЬ

На производстве фармацевтических или медицинских продуктов требуется высокий уровень точности и прецизионности. Все аналитические приборы должны проходить регулярные проверки и контроль с целью заблаговременного обнаружения потенциальных источников ошибок и неточностей. Это другой важный аспект, в котором MPS с автоматизированной опцией взвешивания играет ключевую роль. Аналитические приборы могут значительно влиять на точность результатов анализа, что следует из 35-летнего опыта работы в лаборатории Schülke & Mayr.



С тех пор как Gerstel MPS был установлен в лаборатории Schülke & Mayr, появилась возможность полноценного контроля вариабельности аналитических данных, вызванных системными ошибками и погрешностью измерений. Например, пузырек воздуха может попасть в шприц в процессе набора образца, что приведет к отклонению в его объеме. Это может произойти, если корпус шприца истерся от интенсивного использования и в результате этого воздух стал проходить между плунжером и корпусом. Если сампплер оснащен весами, результирующие вариации объема образца могут быть видимы непосредственно, независимо отслежены, а затем запланированы контрмеры, такие как, например, замена расходных материалов. Это дает уверенность в точности полученных результатов. Без опции взвешивания регулярный или текущий мониторинг системы был бы невозможен.

GERSTEL

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ-МАРКЕРОВ В ПОЧЕЧНОМ ЧАЕ С ПОМОЩЬЮ ВЭТСХ

АВТОРЫ

René De Vaumas,

Extrasynthese

Tiên Do,

CAMAG

Перевод: М.А. Брыкина,

менеджер по продвижению
ГК «Фармконтракт»

АННОТАЦИЯ

Тема данной статьи объединила работу двух компаний, понимающих важность использования фитохимических стандартов высокого качества для исследований лекарственного сырья растительного происхождения и его компонентов, а также применения высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) в качестве стандартного аналитического метода. Независимая компания Extrasynthese (Франция) поставляет сотни эталонных веществ-маркеров, предназначенных для применения при проведении нормативных испытаний и контроля качества, преимущественно с помощью ВЭТСХ. Деятельность лаборатории компании CAMAG ориентирована на международное признание и применение ВЭТСХ в качестве стандартного метода для анализа лекарственного растительного сырья и продуктов на его основе. Данная статья посвящена определению специфических маркеров при разработке ВЭТСХ-методики анализа многокомпонентных растительных экстрактов.

ВВЕДЕНИЕ

Ортосифон (Orthosiphon aristatus) – это индонезийское лекарственное растение, широко используемое в травяном сборе, известном как яванский, или почечный, чай. В нем содержатся фенольные соединения, такие как синенсетин и розмариновая кислота. Исходя из этого, в монографии Европейской фармакопеи в качестве вещества сравнения (маркера) ортосифон был выбран синенсетин, также встречающийся в других растениях.

При проведении тестов методом ВЭТСХ в растениях вида ортосифон были выявлены следы флавоноидов: кроме синенсетина, обнаружены 5,6-диметоксифлавоны и 5-гидрокси-6-метокси-флавоны, которые могут использоваться в качестве специфических маркеров при идентификации ортосифона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

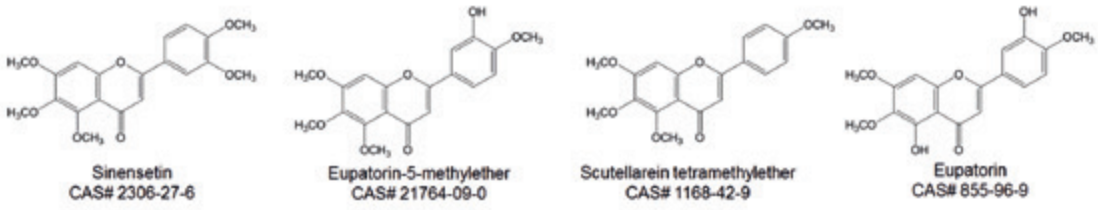
Хроматографическая пластинка

HPTLC plates Si 60 F_{254} (Merck), 20×10 см.

Стандарты

Раствор (1 мг/мл) синенсетина в метаноле и восемь других стандартов сравнения (Extrasynthese); эти соединения были выбраны на основе исследований компании Extrasynthese состава флавоноидов и публикаций Tezura и др. (2000) [1], Sumaryono и др. (1991) [2] и Akowuah и др. (2004) [3].

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ



Пробоподготовка

Навеску около 0,5 г каждой пробы (измельченной до порошка) смешивали с 5 мл метанола и обрабатывали в УЗ-бане в течение 10 мин. После центрифугирования жидкость над осадком отбирали в качестве испытуемого раствора.

Нанесение пробы

Пробу наносили с помощью автоматического аппликатора ATS 4 (CAMAG, Швейцария), 15 треков, ширина 8 мм, дистанция между треками 11,4 мм, отступ от левого края 20 мм, отступ от нижнего края 8 мм.

Элюирование

Хроматографирование выполнялось в автоматической камере ADC 2 (CAMAG, Швейцария) с насыщением 20 мин (с использованием фильтровальной бумаги) в системе толуол – этилацетат – метанол (55:40:5), камеру кондиционировали при относительной влажности 33% в течение 10 мин с использованием насыщенного раствора хлористого магния, элюирование до дистанции фронта 70 мм (от нижнего края), по окончании сушка в течение 5 мин холодным воздухом.

Детектирование

Использовали TLC Visualizer (CAMAG, Швейцария) на 254 нм и 366 нм.

Сканер TLC Scanner 4 с программой visionCATS (CAMAG, Швейцария), измерение поглощения на 254 нм, щель 5x0,30 мм, скорость сканирования 20 мм/с, регистрация спектра в диапазоне от 190 нм до 600 нм.

Масс-спектрометрия

Элюирование зон с помощью TLC-MS Interface (CAMAG, Швейцария) (овальная головка 4x2 мм), масс-детектор модели expression CMS (Advion, США). Обработка данных и оценка масс-спектров осуществлялась с помощью программного обеспечения *Advion Mass Express 2.0* и *Advion Data Express 2.0.50.9* (Advion, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно монографии Европейской фармакопеи №1229 использовали систему для разделения 9 стандартов (рамназин, 4,5,7-триметиловый эфир апигенина, 6-метоксилютеолин, лютеолина тетраметиловый эфир, скутеллареина тетраметиловый эфир, тангеретин, эвпаторин, эвпаторин-5-метиловый эфир, сиенсетин). Только хроматограммы рамназина и 6-метоксилютеолина дают большие «хвосты» (рисунок 1).

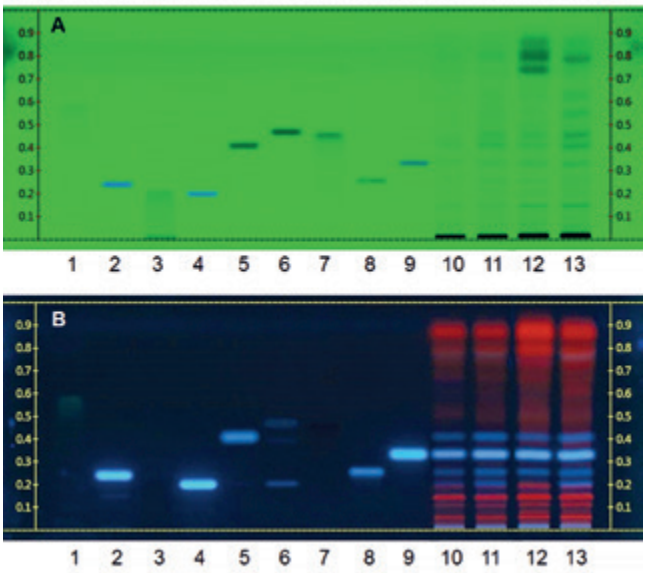


Рисунок 1. Детектирование на 254 нм и 366 нм;

трек 1: рамназин; трек 2: 4,5,7-триметиловый эфир апигенина; трек 3: 6-метоксилютеолин; трек 4: лютеолин тетраметиловый эфир; трек 5: скутеллареин тетраметиловый эфир; трек 6: тангеретин; трек 7: эвпаторин; трек 8: эвпаторин-5-метиловый эфир; трек 9: сиенсетин; треки 10-13: *Orthosiphon aristatus*

С целью подтверждения присутствия выбранных веществ в образцах исследовали различные режимы детектирования и записывали различные УФ-спектры. Например, при элюировании в системе толуол – этилацетат – метанол (55:40:5) при 254 нм и 366 нм перед дериватизацией были обнаружены эвпаторин-5-метиловый эфир и тангеретин, а также и при 366 нм после двухэтапной дериватизации [сначала аминоэтиловым эфиром дифенилборной кислоты (NP-реактив), а затем реактивом анисовый альдегид-серная кислота] (рисунок 2).

На хроматограммах испытуемого раствора до и после дериватизации (A-D) обнаруживались зоны с hR_F и цветом, аналогичные пятну эвпаторин-5-метилового эфира. Его присутствие было подтверждено сравнением УФ-спектров стандартного раствора и проб (E-H). Что касается пятен,

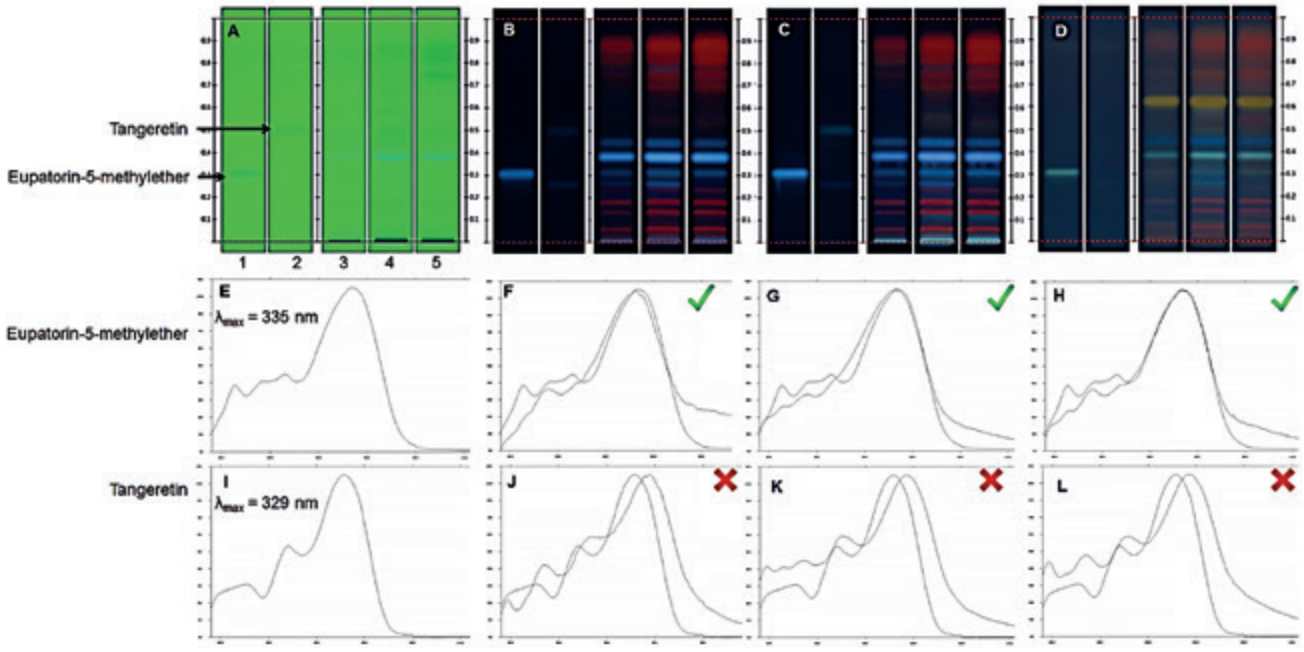


Рисунок 2. **Эвпаторин-5-метиловый эфир (трек 1) и тангеретин (трек 2) в 3 образцах яванского чая; треки 3 и 4: Orthosiphon aristatus (Blume) Miq; трек 5: яванский чай, при 254 нм (A), при 366 нм (B), при 366 нм после дериватизации NP-реактивом (C), при 366 нм после дериватизации с анисовым альдегидом (D), УФ-спектр эвпаторин-5-метилового эфира (E), сравнение с соответствующими зонами в трех образцах (F-H), а также тангеретин (I), сравнение с соответствующими зонами в трех образцах (J-L)**

относящихся к тангеретину, хроматограммы испытуемого раствора не имели зон с hR_F R_F (A). Снимок на длине волны 366 нм после дериватизации A (D) показал пятно тангеретина как бледно-голубую флуоресценцию, которая не видна в испытуемом растворе в этом положении. УФ-спектр, соответствующий пятну с hR_F в испытуемых растворах, подтверждает, что тангеретин отсутствует в трех образцах яванского чая (I-L).

ВЭТСХ-МС дает подтверждение определяемых веществ. Присутствие эвпаторин-5-метилового эфира и отсутствие тангеретина в трех образцах подтверждено с помощью масс-спектрометрии (рисунок 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наряду с ранее установленным маркером – синенсетином, в качестве специфических маркеров, подходящих для оценки подлинности образцов *Orthosiphon aristatus (Blume) Miq*. методом ВЭТСХ, были определены: тетраметиловый эфир скутеллареина, эвпаторин и эвпаторин-5-метиловый эфир. Присутствие этих четырех маркеров в профиле флавоноидов специфично только для яванского чая.

ЛИТЕРАТУРА

1. Y. Tezuka et al. Constituents of the Vietnamese medicinal plant Orthosiphon stamineus // Chem. Pharm. Bull. 2000. V. 48. P. 1711–1719.
2. G.A. Akowuah et al. Radical scavenging activity of methanol leaf extracts of *Orthosiphon stamineus* // Food Chem. 2004. V. 87. P. 559–566.
3. W. Sumaryono et al. Qualitative and quantitative analysis of the phenolic constituents from Orthosiphon aristatus // Planta Medica. 1991. V. 57. P. 176–180.

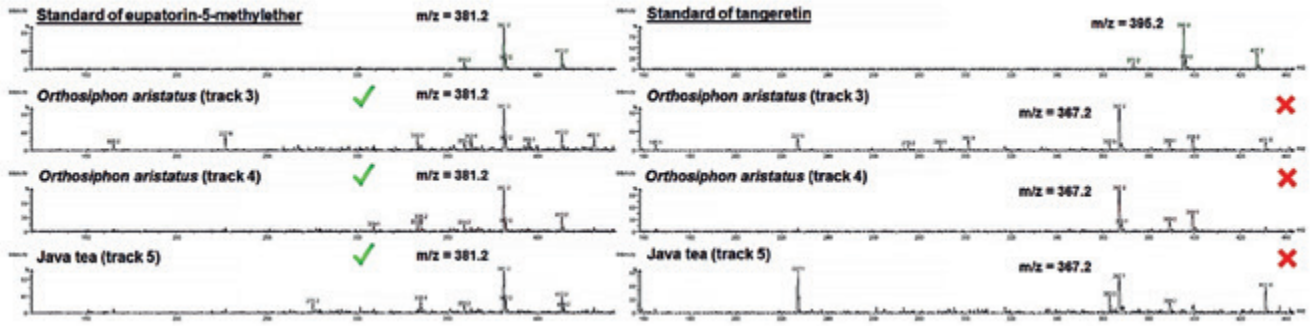


Рисунок 3. **Спектр ВЭТСХ эвпаторин-5-метилового эфира и тангеретина и сравнение с соответствующими зонами в образцах**

NATOLI
YOU DEMAND. WE DELIVER.

ВЫБОР ФОРМЫ ТАБЛЕТКИ: ВАЖНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ И МАРКЕТИНГОВЫЙ НЮАНС

АВТОР

Дейл Натоли (Dale Natoli),

президент Natoli Engineering

Перевод: А.М. Гринченко,

руководитель отдела
готовых лекарственных форм
ГК «Фармконтракт»





Дейл Натоли (Dale Natoli), президент Natoli Engineering

АННОТАЦИЯ

Первые впечатления играют весомую роль в принятии решения. Таблетки в фармацевтической, пищевой и кондитерской отраслях не являются исключением. Разборчивые потребители могут принимать решения, основываясь не только на их опыте использования данной продукции, но и на основе ее внешнего вида. В этой статье рассмотрены недостатки фаски и преимущества скругленных краев плоскоцилиндрических таблеток.

ВВЕДЕНИЕ

Размер таблетки, ее форма, цвет и восприятие легкости ее принятия – эти характеристики быстро оцениваются покупателем при первом взгляде на продукт. Вид таблетки в первую очередь должен формировать у покупателя/пациента представление, что при ее проглатывании он не почувствует никаких неприятных ощущений, в том числе привкусов.

Производитель таблеток должен учитывать это при производстве и предлагать клиенту таблетки, которые будут создавать впечатление своеобразной конфеты. При выпуске таблетки необходимо обратить внимание на общий вид, на гладкую форму и прочие параметры, на которые обращают внимание покупатели/пациенты.

Ввиду этого отдел маркетинга должен всегда принимать непосредственное участие в разработке дизайна не только упаковки, но и самого продукта. Но при этом необходимо понимать, что исключать в данном процессе технических специалистов невозможно, так как они несут ответственность за выпуск конечного продукта. Производственный отдел, имея значительный опыт в технологии, может снизить себестоимость продукта, понимая особенности технологического процесса. Например, основываясь на форме таблетки, можно существенно снизить стоимость затрат на пресс-инструмент, а итоговая форма таблетки может потребовать высокого усилия прессования.

«Хороший дизайн таблетки может помочь компании увеличить долю рынка, получить дополнительную прибыль и помочь завоевать доверие потребителя. В свою очередь, плохой дизайн может привести к сотне тысяч, а то и миллионам убытка, значительному снижению доходов от продаж, а также к увеличению себестоимости продукта», – говорит Дейл Натоли (Dale Natoli), президент компании Natoli Engineering, клиентами которой являются крупнейшие производители фармацевтических, ветеринарных препаратов и БАДов.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Одним из примеров разработки такого рода форм таблеток стали плоскоцилиндрические таблетки с фаской (Flat Faced Bevel Edge, FFBE), дизайн которых создавался для улучшения качества таблеток и снижения себестоимости их производства. FFBE-таблетки стали когда-то популярными во время использования роторных таблеточных прессов ввиду лучшего товарного вида в сравнении с классической плоскоцилиндрической таблеткой. Вид таблетки страдал из-за ее хрупкой кромки, ее ломкости и частых сколов, так как при такой форме не удавалось достичь необходимых характеристик по плотности у края таблеток. При прессовании такой таблетки часть энергии уходила к стенкам матрицы. Простое решение в виде фаски позволило сконцентрировать энергию прессования в центру таблетки, тем самым увеличив не только ее прочность, но и избавив от внешних недостатков в виде хрупких краев. Многие десятилетия таблетка FFBT была очень популярной. Однако такая таблетка имеет свои ограничения, в том числе по силе прессования из-за высокого риска повреждения матрицы вследствие чрезмерной компрессии.

РАСТУЩАЯ ПОПУЛЯРНОСТЬ ТАБЛЕТОК С ГЛАДКИМ КРАЕМ

Основываясь на опыте клиентов и на собственных разработках, компания Natoli Engineering, как мировой лидер в области производства пресс-инструмента и комплектующих к таблеточным прессам, рекомендует производителям таблеток без покрытия переходить на выпуск плоскоцилиндрических таблеток со скруглённым краем (Flat Faced Radius Edge, FFRE), вместо таблеток с фаской (FFBE).

«Наши рекомендации предоставляются исключительно в интересах наших клиентов, – говорит Natoli. – Мы не имеем никаких финансовых выгод при выборе клиентом той или иной формы таблетки (FFRE или FFBE)».

После детального инженерного анализа таблеток FFBE и FFRE одинакового размера было установлено, что таблетки FFRE требуют меньшего усилия прессования. Это дает возможность улучшить характеристики прочности таблеток (и другие характеристики), а также снизить давление прессования, что является немаловажным моментом при использовании таблеточных прессов. Таким образом, производитель не только улучшит качество таблетки, но и сможет увеличить срок службы оборудования и расходных материалов.

На первый взгляд, таблетка формы FFRE даже неотличима от FFBE, но она не имеет острых граней. Благодаря этому потребитель, глотая таблетку, будет испытывать меньший (или не испытывать вовсе) дискомфорт и меньше неприятных ощущений во рту и гортани. Это особенно важно для потребителей в возрасте, которые часто испытывают трудности при глотании таблеток. Эти преимущества могут сыграть весомую роль в итоговом выборе потребителя. Именно поэтому на данный нюанс следует обращать внимание не только производственному департаменту, но и маркетологам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Специалисты Natoli Engineering отмечают в последнее время существенный рост количества компаний, которые переходят от производства непокрытых оболочкой таблеток формы FFBE к форме FFRE. Эта тенденция показывает, насколько важен данный технический нюанс.

FFBE VS FFRE

FFRE-таблетки имеют более пологие края в сравнении с FFBE-таблетками.

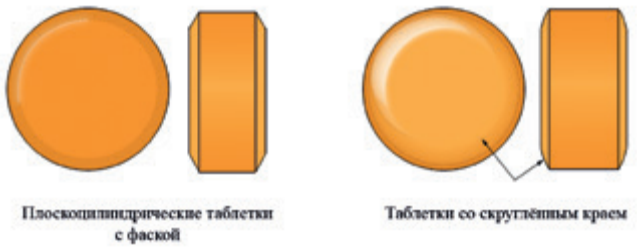


Рисунок 1. **FFBE и FFRE-таблетки**

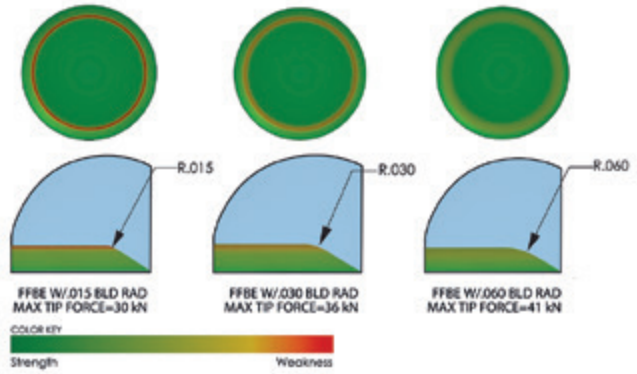


Рисунок 2. **Зависимость усилия прессования от радиуса кромки**



Рисунок 3. **Пресс-инструмент компании Natoli Engineering**

KINEMATICA AG
Dispersing and Mixing Technology

ВЫСОКОСКОРОСТНЫЕ ДИСПЕРГАТОРЫ ДЛЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПРИ АНАЛИЗЕ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

ПЕРЕВОД:

М.А. Брыкина,

менеджер по продвижению
ГК «Фармконтракт»



АННОТАЦИЯ

Высокая точность анализа возможна только при условии полной гомогенности образцов. Специально для высокоэффективной пробоподготовки при анализе активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) компания KINEMATICA разработала диспергирующие элементы POLYTRON® PT-DA 20/2XEC-E116, обеспечивающие быстрое измельчение образцов в небольших объемах растворителя. Данные, индивидуально комплектуемые системы можно адаптировать для различных условий применения.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс производства таблеток, драже, суппозиториев и других готовых лекарственных форм состоит из многочисленных технологических этапов. Таблетирование может включать этап гранулирования порошка перед прессованием в формы. При дражировании, состоящем также из нескольких стадий, на таблетки наносится оболочка, выполняющая различные функции, среди которых направленное высвобождение активных ингредиентов, подкрашивание или маскирование неприятного привкуса компонентов. Заключительным этапом производства является упаковка. Только точный контроль и измерения могут гарантировать стабильное качество на всех этапах производства.

Для лабораторного анализа и контроля качества таблеток требуется использование аналитического раствора с гомогенно перемешанными ингредиентами. В отличие от порошка, который по своей природе смачивается очень легко, таблетки с оболочкой требуют дробления.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ТЕХНОЛОГИЯ ДИСПЕРГИРОВАНИЯ РОТОР/СТАТОР

Кинетический принцип работы диспергаторов основан на создании ротором, приводимым в движение двигателем, вакуума внутри статора, который втягивает подвергаемую диспергированию таблетку. В процессе работы механизма ротор/статор вещества ускоряются под действием центробежных сил и попадают в кольцевой зазор между ротором и статором. Частицы вещества подвергаются воздействию значительных тормозящих и касательных сил и радиального ускорения. При достижении очень высоких центробежных сил отдельные частицы начинают распадаться. Дальнейшие режущие и динамические воздействия позволяют уменьшить размер частиц еще сильнее. Превосходная гомогенизация компонентов таблеток обеспечивается возникающей во время процесса экстремальной турбулентностью.

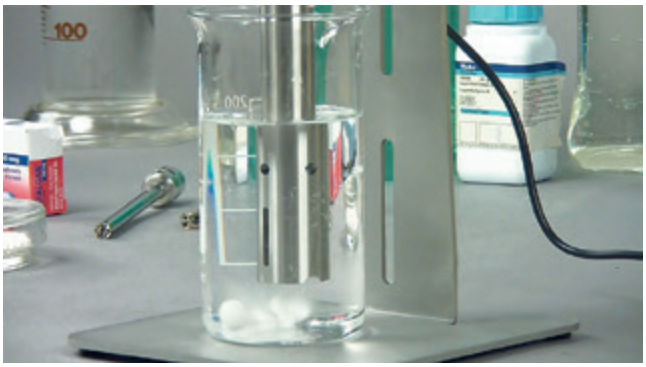


Рисунок 1. Процесс работы диспергатора KINEMATICA POLYTRON® PT 1200 E

Даже самый лучший привод ничего не значит без высокотехнологичной системы, удобной для пользователя и оптимальной для области применения. Диспергирующий элемент POLYTRON® PT-DA 20/2XEC-E116 спроектирован специально для ультрабыстрого дробления таблеток, драже и суппозиториев. Агрегат вставляется в привод с помощью быстроразъёмного соединения. Два сбалансированных зубца ротора различной длины разрушают таблетки на мельчайшие компоненты и вытесняют их в две щели трубки статора. Длительность процесса составляет в среднем 4–6 с, позволяя достичь необходимых показателей диспергирования. Специальная геометрическая форма агрегата предотвращает его заклинивание и загрязнение образцом. Получаемый раствор – это прекрасная основа для анализа активных фармацевтических ингредиентов (АФИ).

После использования агрегат необходимо очистить. Разобрать и собрать агрегат можно легко и быстро, без использования каких-либо дополнительных инструментов. Ручное перемещение фторопластового зажима освобождает ротор и позволяет выдвинуть его из трубки статора. Это означает, что вместе с фторопластовыми подшипниками скольжения необходимо очистить только две детали из нержавеющей стали (например, с помощью автоклавирования).

ДИСПЕРГИРУЮЩИЕ СИСТЕМЫ

Диспергирующие системы состоят из привода, блока управления, соединительных компонентов и самого диспергирующего элемента. Диспергаторы серии PT 1200 E и PT 1300D смогут впечатлить пользователей удобством использования, работой от низкого напряжения 24 В переменного тока и скоростью вращения до 30000 об/мин. Различные функциональные аксессуары, включая опциональный штатив из нержавеющей стали, позволяют создать компактную систему, отвечающую специфическим требованиям.

Для контроля скорости вращения доступны различные опциональные возможности:

- **С управлением**: по умолчанию скорость вращения немного снижается при возрастании нагрузки, например, из-за увеличения вязкости (привод PT 1200 E).
- **С регулированием**: по умолчанию скорость вращения регулируется вне зависимости от нагрузки, т.е. всегда остается постоянной (даже при увеличении вязкости) (привод PT 1300 D и выше).
- **С настройкой / регулированием с помощью ПК**: по умолчанию скорость вращения регулируется вне зависимости от нагрузки. Другие параметры также могут быть заданы (приводы PT 1300 D, PT 3100 D, PT 6100D).

Агрегат PT-DA 20/2XEC-E116 для диспергирования таблеток и драже имеет и другие функции, позволяющие соответствовать меняющимся требованиям.

Стандартные диспергирующие элементы компании KINEMATICA доступны в диапазоне диаметров от 3 мм до 12 мм. Наименьший агрегат диаметром 3 мм разработан специально для подготовки к анализу сверхмалых количеств (от 0,05 мл до 5,0 мл) образцов клеток животных или растений. Для гомогенизации волокнистых, вязких и твердых образцов (например, для подготовки образцов тканей) рекомендуется использовать агрегат диаметром 12 мм с W-образными зубцами.

Все диспергирующие агрегаты поддерживают технологию EasyClean, делающую очистку системы невероятно легкой.



Рисунок 2. Агрегат POLYTRON® PT-DA 20/2XEC-E116 в разобранном виде

ИНТЕГРАЦИЯ БИО-ДЕКОНТАМИНАЦИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ionHP® В АСЕПТИЧЕСКИЕ БАРЬЕРНЫЕ СИСТЕМЫ

АВТОР

Тони Родэс (Tony Rhodes)*,

технологический центр
барьерных изоляционных технологий
TELSTAR

Перевод: М.А. Брыкина,

менеджер по продвижению
ГК «Фармконтракт»

АННОТАЦИЯ

Компания Azbil Telstar (Великобритания) проводит исследования альтернативных экономически эффективных систем биодеконтаминации для последующей интеграции их в собственную линейку стерильных изоляторов, переходных люков MAS и других изоляторов для асептического производства (рисунок 1).

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении многих лет в фармацевтической и медицинской отрасли традиционно используются VHP®-технологии (Vaporised Hydrogen Peroxide – испарение пероксида водорода H_2O_2) и работающие на их основе биодеконтаминационные системы. Широкое применение данных систем, без сомнения, доказывает, что пероксид водорода – это высокоэффективный стерилизатор, разлагающийся только на кислород и воду без окисления поверхностей.



Рисунок 1. Стерильные изоляторы Telstar

* Перевод статьи ionHP powered by TOMI // Pharmaceutical Processing Journal. 2015.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Перед специалистами компании Azbil Telstar была поставлена задача создать конкурентоспособную биодеконтаминационную систему, не уступающую по эффективности, степени очистки и общей производительности и обеспечивающую воспроизводимый цикл биодеконтаминации с 6-кратным логарифмическим уменьшением общего количества микробов, валидируемый с использованием биоиндикаторов со спорами *Geobacillus stearothermophilus*.

Были детально изучены туманные системы, все чаще устанавливаемые в чистых комнатах и лабораториях для проведения биодеконтаминации, но до сих пор не модифицированные для внедрения в барьерные технологии. Принцип функционирования этих систем заключается в том, что подаваемый под давлением стерилизатор распыляется форсунками, образуя частицы микронного размера, создающие сухой туман.

Физика определяет сухой туман как скопление капель, средний диаметр которых меньше 10 микрон, а максимальный диаметр не превышает 50 микрон (рисунок 2).

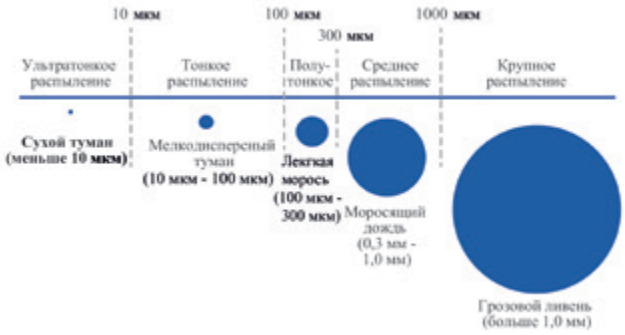


Рисунок 2. **Классификация капель по размеру**

Стоит отметить, что капли размером меньше 1 микрона имеют специфическую гидроневесомость. Другими словами, аэродинамическое сопротивление уравновешивает силу тяжести, вследствие чего такие капли, известные также под названием TSP (Totally Suspended Particles – абсолютно взвешенные частицы), будут практически безгранично плавать в воздухе.

Примерное время осаждения частиц в условиях застойного и турбулентного воздуха приведено на рисунках 3, a–c (на основании данных Национального института гигиены и безопасности труда и Центра контроля и профилактики заболеваний).

Изучение этих данных показало, что мелкодисперсное распыление является наиболее подходящим механизмом распределения стерилизатора. Однако из-за вероятности длительного времени оседания частиц мелкого размера на стерилизуемую поверхность и, следовательно, продолжительного периода их возврата в биодеконтаминационный цикл у специалистов возникли серьезные опасения.

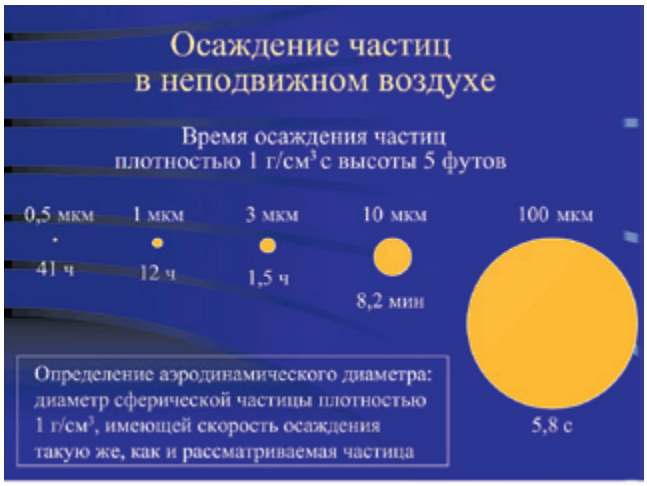


Рисунок 3a. **Примерное время осаждения частиц в неподвижном воздухе**

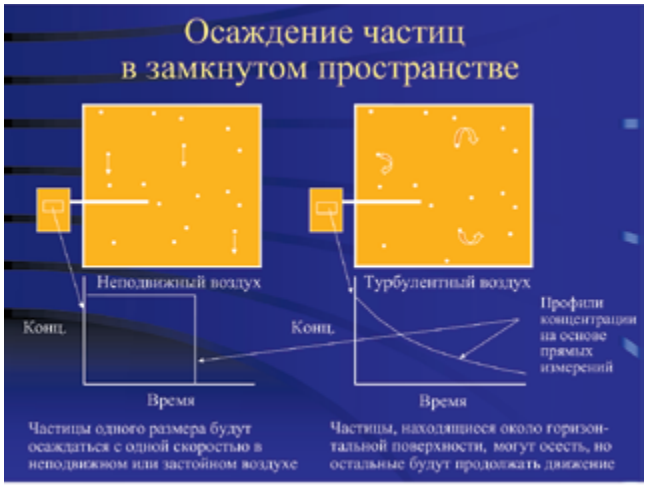


Рисунок 3b. **Осаждение частиц в закрытой комнате или в замкнутом пространстве с застойным или турбулентным воздухом**

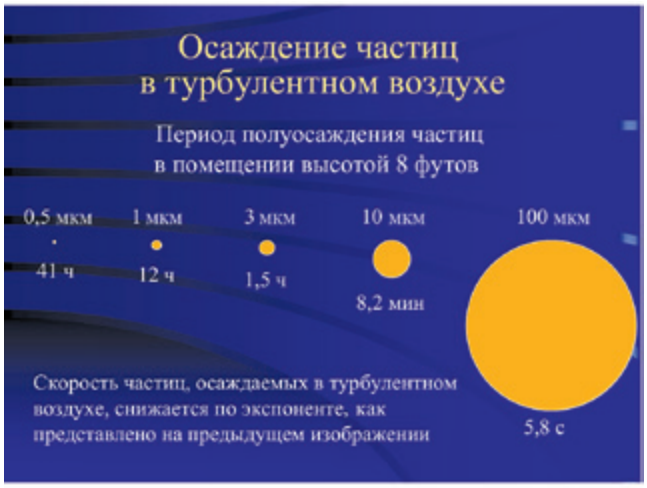


Рисунок 3c. **Примерное время осаждения частиц при турбулентном воздухе**

Вскоре было установлено, что для систем биодеконтаминации этого типа не требовалось проведение кондиционирования как обязательного условия задания определенной влажности или температуры в барьерных системах. Нормальная влажность и температура в лабораториях, чистых помещениях или даже неприспособленных условиях промпредприятия Telstar в Великобритании не влияли на эффективность.

Типичный биодеконтаминационный цикл для туманных систем имеет следующие этапы:

- впрыск жидкости;
- время выдерживания;
- аэрация.

Было также обнаружено, что стерилизатор остается практически в жидком состоянии и не превращается в газ, при этом уровень ppm пероксида водорода H_2O_2 остается очень низким во время впрыска и выдержки времени и возрастает приблизительно до 300–400 ppm при испарении в период аэрации.

Что касается размера частиц, то подозрения были подтверждены. Наблюдения показали, что если жидкость подается при высоком давлении, то состоящему из маленьких капель туману требуется несколько часов для оседания на поверхности изолятора и на других материалах внутри камеры.

Увеличение размера капель путем уменьшения давления, при котором подается жидкость, снижает продолжительность этапа впрыска жидкости и немного уменьшает время выдерживания. Капли большего размера оседают быстрее, как и было спрогнозировано на основе расчетных данных. Однако результаты наблюдения за каплями большого размера показали, что поверхность изолятора становится влажной и требует долгого периода аэрации для просушки. Очевидно, что первостепенным условием использования сухого тумана в этом типе систем биодеконтаминации является обеспечение отсутствия избыточного увлажнения поверхности изолятора.

Используя систему аэрозольного орошения в качестве метода биодеконтаминации в изоляторах и других замкнутых пространствах, можно воспроизводить параметры цикла. При этом поведение мелкодисперсных капель стерилизатора, в случае их возникновения, в замкнутом пространстве камеры изолятора становится непредсказуемым. Поэтому воспроизводимость и валидация биодеконтаминационного цикла с применением биоиндикаторов становится невозможной.

ТЕХНОЛОГИЯ ionHP®

На данном этапе исследований специалисты переключили свое внимание на ionHP® (ионизированный пероксид водорода). Согласно имеющейся информации эта технология была разработана в 1990 г. в министерстве обороны США. ionHP® представляет собой ионизированный аэрозоль, состоящий из различных реакционно-способных молекулярных частиц внутри водной матрицы. Каждая частица аэрозоля содержит миллиарды активированных молекул. Жидкий стерилизатор проталкивается через запатентованные форсунки, создавая туман. Этот туман вместе с азотом проходит через холодную плазму 17000v, таким образом генерируется поле ионизированного азота, предающее туману две важные характеристики:

1. Туману передаются электростатические заряды, которые заставляют его вести себя больше как газ вследствие обоюдно отталкивающихся положительно заряженных частиц. Положительные заряды передаются каплям, которые потом притягиваются к поверхности отрицательно заряженного изолятора.
2. При диссоциации жидкого раствора образуются гидроксильные радикалы, активные формы кислорода (ROS), O_3, активные формы азота (RNS), плазма, УФ- и термическая активация, обеспечивающие синергетический эффект множества антимикробных средств (рисунок 4).



Рисунок 4. Графическое изображение процесса

Расширенные характеристики системы ionHP® по сравнению с системами сухого тумана обеспечивают лучший контроль тумана при введении его в изолятор. Более эффективное распределение и немедленная диссоциация жидкости приводит к снижению скорости впрыска и уменьшает время выдерживания. Очевидно также, что внутренняя поверхность изолятора не увлажнилась, как было в эксперименте с системой сухого тумана.

После предварительных испытаний стало понятно, что ionHP® является предпочтительным вариантом биодеконтаминации для асептических барьерных систем.

Результаты пробных испытаний ionHP®, проводимых в стерильном изоляторе Telstar типа 4, показали воспроизводимое логарифмическое уменьшение микробиологической нагрузки, валидированное с ис-

пользованием узких биоиндикаторов из нержавеющей стали.

Технические характеристики стерильного изолятора:

Класс воздуха	ISO класс 5 (EUGMP сорт A) для всех камер
Спектр обтекания воздушным потоком	Прямоточный турбулентный поток по всем камерам
Кратность воздухообмена	150 воздухообменов/ч, минимально для всех камер при нормальном функционировании 240 воздухообменов/ч, основная камера во время аэрации 400 воздухообменов/ч, передаточная камера во время аэрации
Рабочее давление	+50 Па, основная камера +35 Па, передаточная камера
Уровень освещенности	700 лк, только внутри основной камеры
Уровень шума	Менее чем 70 дБА
Температура	Нерегулируемая (только мониторинг)
Влажность	Нерегулируемая (только мониторинг)
Фильтрация на входе и выходе	Фильтр HEPA H14 эффективностью 99,997%, испытание на герметичность полного сечения с фотометром в соответствии с PD6609, испытание воздушного фильтра аэрозолем диоктилфталата с ипользованием теплогенератора. (Эффективность фильтрации 99,995% в соответствии с EN1822). На входе HEPA фильтр защищен фильтрами предварительной очистки EU10

Следующим этапом стала разработка и внедрение защищенной PLC-системы управления процессом биодеконтаминации ionHP® в линейку стерильных изоляторов, люков для передачи материалов и других асептических барьерных систем (рисунок 5). Система управления позволяет точно регулировать и проводить мониторинг подачи стерилизатора с помощью высокоэффективного дозировочного насоса, контролировать давление воздуха с использованием регулятора массового расхода и датчиков давления, а также проводить мониторинг концентрации пероксида водорода H_2O_2 внутри камеры в процессе биодеконтаминации. С ее помощью можно проводить разработку воспроизводимого биодеконтаминационного цикла, валидируемого BI challenge, и обеспечивать в режиме реального времени запись параметров цикла с помощью безбумажного регистрирующего устройства, соответствующего правилу 21 CFR Part 11, совместно с выводом печатной копии.

Стандартные параметры цикла, которые были валидированы с использованием BI challenge:

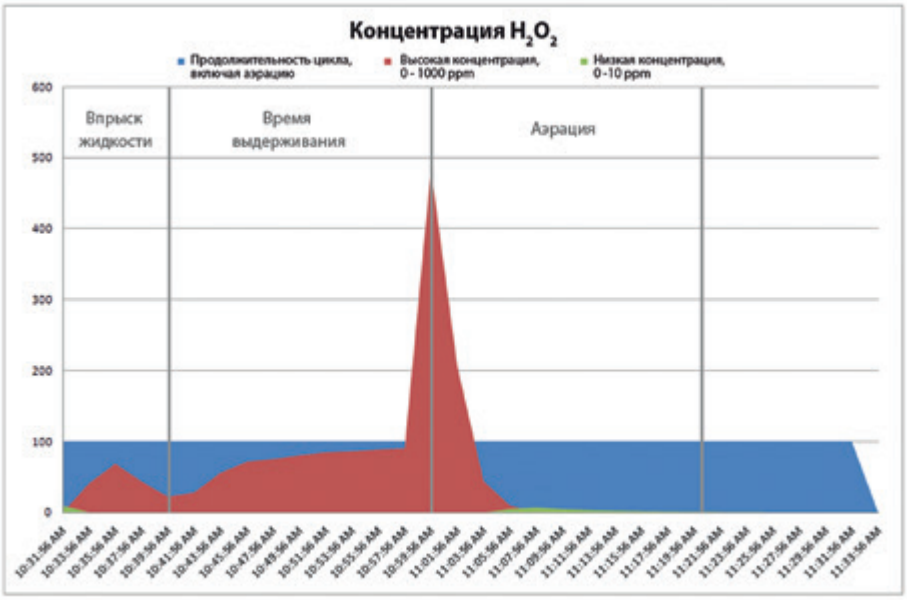
- расход стерилизатора 5 мл/мин;
- расход воздуха 20 л/мин;
- период впрыска 7 мин;
- период выдержки 20 мин;
- аэрация 20 мин (достижение концентрации <1ppm H_2O_2).



Рисунок 5. Стандартный режим загрузки изолятора: слева – передаточный люк, справа – основная камера

Ниже представлены графические выводы параметров цикла, записанные с помощью безбумажного регистрирующего устройства для мониторинга биодеконтаминационного цикла (рисунки 6 a–b).

Возросшая эффективность этой технологии, внедренной в биодеконтаминационный цикл, отражается также на объемах используемого стерилизатора. Стерилизатор ionHP® использует только пероксид водорода с концентрацией 7,5% по сравнению с используемым в обычных системах с концентрацией 35%.



a



b

Рисунок 6. **Графические выводы параметров цикла, записанные с помощью безбумажного регистрирующего устройства**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Преимущества внедрения технологии ionHP® в качестве альтернативной биодеконтаминационной системы включают улучшение эффективности и результативности биодеконтаминации технологического оборудования для фармацевтических и биотехнологических областей применения:

- сухой туман с характеристиками газовой системы;
- увеличение экономической эффективности при снижении начальных капиталовложений;
- уменьшение продолжительности биодеконтаминационного цикла благодаря отсутствию необходимости в начальной подготовке камеры, снижение времени простоя производства, связанного с проведением биодеконтаминации;
- деконтаминация с высоким уровнем эффективности;
- меньшее количество используемого стерилизатора позволяет снизить эксплуатационные расходы;
- более низкий уровень опасности с учетом совместимости материалов и процедур передачи в связи с использованием пероксида водорода концентрацией всего 7,5%.

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

ПЕРЕВОД:

М.А. Брыкина,

менеджер по продвижению
ГК «Фармконтракт»

АННОТАЦИЯ

Компания Sigma Laboratory Centrifuges – это ведущий международный производитель лабораторных центрифуг – стандартного оборудования, широко используемого для разделения компонентов различной плотности.

Компания Sigma предлагает различные типы лабораторных центрифуг с угловыми роторами, бакет-роторами и вспомогательным оборудованием, соответствующим высоким стандартам надежности и безопасности. Лабораторные центрифуги Sigma с успехом применяются в химической, фармацевтической, биотехнологической и медицинской отраслях.

Мартин Крист (Martin Christ) начал производить центрифуги в 1948 г. В 1975 г. он основал компанию Sigma Laborzentrifugen. Новый, не требующий технического обслуживания механизм привода для лабораторных центрифуг позволил компании Sigma получить международное признание, что обусловило дальнейший быстрый рост компании.

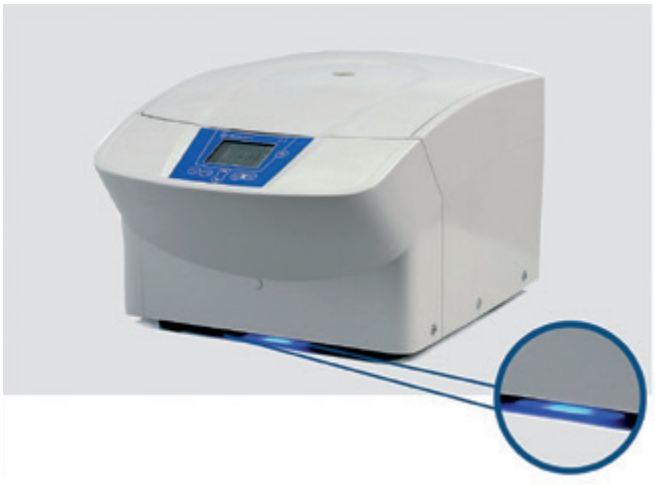




Рисунок 1. **Синяя светодиодная индикация работы**

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

SIGMA 2-7: ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ В НОВОМ КОНСТРУКТИВНОМ ИСПОЛНЕНИИ

Центрифуги Sigma известны благодаря своим техническим характеристикам, надежности и высоким стандартам безопасности. Широкий модельный ряд компании Sigma позволяет заказчику выбрать оптимальное решение для каждой конкретной задачи: настольные или напольные центрифуги, микроцентрифуги, центрифуги с системой охлаждения или нагрева, медицинские центрифуги, высокоскоростные центрифуги, центрифуги с очень низким уровнем шума и др.

Новая настольная центрифуга Sigma 2-7 от компании Sigma Laboratory Centrifuges специально разработана для применения в лабораториях, требующих надежного универсального оборудования, отличающегося простотой использования и низким уровнем шума. На основании опыта и пожеланий заказчиков в центрифугу Sigma 2-7 был добавлен ряд опций, ключевой из которых является наличие в нижней части центрифуги синей светодиодной индикации на поверхность стола, подающей четкий сигнал операторам «в работе» (рисунок 1).

Для задач диагностики крови в кабинетах врача была внедрена другая инновационная опция – возможность программирования времени свертывания, например, для пробирок с активатором свертывания сыворотки. Это позволяет оптимизировать рабочий процесс, поскольку центрифуга функционирует по установленному пользователем времени свертывания: запуск центрифугирования происходит автоматически; звуковой сигнал и автоматическое открытие механизированной крышки сигнализирует о завершении процесса. Благодаря возможности программирования центрифуги работать с различными типами пробирок стало еще удобнее.

Встроенная система воздушной вентиляции имеет сверхнизкий уровень шума и обеспечивает минимальное повышение температуры образцов даже при максимальной нагрузке. Другие отличительные особенности, среди которых датчик дисбаланса и бакет-ротор с адаптерами для различных типов стаканов, делают центрифугу действительно универсальной в работе.

Общий обзор Sigma 2-7

- Синяя светодиодная индикация работы.
- Дисплей с контрастным изображением.
- Большие кнопки.
- Минимальное увеличение температуры в процессе работы.
- Не требующий обслуживания привод с бесщеточным двигателем.
- Моторизированный замок крышки, автоматическое открывание крышки.
- Запоминание последнего цикла центрифугирования.
- 2 кривые ускорения и торможения (плавная или быстрая).
- Программируемое время свертывания для пробирок с сывороткой.
- Датчик дисбаланса.
- Аварийная разблокировка крышки.
- Окно в крышке для визуального контроля процесса вращения.
- Контроллер превышения скорости.
- Соответствие требованиям EN 61010-2-020 и RoHS.

Технические характеристики

Потребление электроэнергии при напряжении 100–240 В, Вт	210
Максимальная вместимость, (кол-во х объем пробирок в мл)	30x15, 4x100
Максимальная скорость, об/мин	4000
Минимальная скорость, об/мин	100
Макс. центробежное ускорение, хг ротор 11071 + стакан 13299 ротор 11071 + стакан 13296 ротор 11037 + стакан 13035 роторы 12072, 12073	 2540 2379 2379 2486
Подавление помех	EN 61326
Длина х Ширина х Высота, мм	293 x 378 x 535
Масса без ротора, кг	23
Макс. кинетическая энергия, н/м	1,821
Уровень шума (ротор 11071, стакан 13299)	~55 дБ (А)
Макс. время ускорения (ротор 11071 и стакан 13299), с	12
Мин. время ускорения (ротор 11071 и стакан13299), с	12
Установка времени	10 с – 99 мин 59 с
Шаг по времени, с	1
Режим непрерывной работы	+
Режим кратковременной работы	+
Шаг задания скорости, об/мин	100
Шаг задания ускорения, хг	10
Отображение скорости или перегрузки	+
Кривая разгон-торможение	Быстрая, плавная
Программирование	10 программ центрифугирования
Микропроцессорное управление	+

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЛИОФИЛЬНАЯ СУШИЛКА ALPHA 1-2 LDPLUS ОТ CHRIST

ПЕРЕВОД:

М.А. Брыкина,

менеджер по продвижению
ГК «Фармконтракт»



АННОТАЦИЯ

Компания Martin Christ Freeze Dryers – это ведущий мировой разработчик и производитель лабораторных, пилотных и промышленных систем лиофилизации и оборудования для ротационного концентрирования под вакуумом.

Все оборудование Christ производится в соответствии с самыми строгими требованиями, обеспечивая наибольшую выгоду для заказчиков.

В своей деятельности компания уделяет особое внимание проведению научных исследований и разработок, постоянно доказывая свое лидерство за счет технологических инноваций в области лиофильной сушки и ротационного концентрирования под вакуумом, что подтверждается десятками патентов.



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

СУБЛИМАЦИОННАЯ СУШКА

Лиофилизация, также называемая сублимационной сушкой, является наиболее щадящим методом сушки продукта. Она основана на физическом явлении сублимации, при котором вещество из твердого состояния переходит в газообразное, минуя стадию превращения в жидкость. Замороженный продукт сушится в условиях вакуума без оттаивания.

Этот метод с успехом применяется в различных областях для решения широкого круга задач:

- сохранение характеристик исходного вещества (например, при производстве фармацевтических препаратов или кофе);
- сохранение исходной формы продукта (например, при обработке таксидермических образцов, археологических объектов, цветов или книг);
- приведение продукта в определенное состояние (например, сублимированные фрукты в йогурте);
- пробоподготовка для химического и биохимического анализа (например, при исследовании микропримесей в пищевых продуктах или почвах).

ЛИОФИЛЬНАЯ СУШКА ALPHA 1-2 LDPLUS

Разработанная компанией Christ лиофильная сушилка Alpha 1-2 LDplus представляет собой универсальный инструмент для успешного ежедневного проведения процессов лиофилизации в лаборатории.



Набор для лиофилизации Package Alpha 1-2 LDplus включает в себя:

- лиофилизатор Alpha 1-2 LDplus;
- вакуумный насос с выпускным фильтром и вакуумным шлангом;
- датчик вакуума;
- акриловая камера;
- опорная пластина для сушки внутри камеры;
- 6 резиновых вентилей для сушки в колбах на подвесе.

Наилучшие результаты

Инновационные технологии и высокое качество лиофильной сушилки Alpha 1-2 LDplus позволят Вам получить наилучшие результаты. Основными преимуществами установки являются:

1. Компактная модульная конструкция, отличающаяся небольшими требованиями к размещению.
2. Сушильная камера расположена непосредственно над конденсором льда для повышения производительности и сокращения продолжительности процесса.
3. Камера конденсора льда и спираль выполнены из высококачественной нержавеющей стали.
4. Легкость доступа к конденсору и прекрасный визуальный контроль процесса.
5. Быстрое оттаивание горячими парами теплоносителя.
6. Очистка/деконтаминация, включая сливной кран.
7. Цифровая индикация температуры конденсора льда, косвенное определение температуры образца.

Технические характеристики

Конденсор льда • Макс. емкость • Производительность • Температура • Объем камеры	 2,5 кг 2 кг/24 ч ~ -55°C ~ 3,5 л
Система охлаждения	0,43 кВт
Вакуумный насос: • Производительность • Предельный вакуум	 2,3 $м^3$/ч 2 x 10^3 мбар (гПа)
Источник питания (по запросу другие значения напряжения)	230 В / 50 Гц

BREVETTI ANGELA®
Advanced manufacturing technologies

ТЕХНОЛОГИЯ BFS (ВЫДУВАНИЕ – НАПОЛНЕНИЕ – ЗАПАИВАНИЕ)

Статья предоставлена компанией BREVETTI ANGELA S.R.L.

Рецензирование: А.М. Гринченко,
руководитель отдела ГЛФ
ГК «Фармконтракт»

ВВЕДЕНИЕ

Ужесточение требований к качеству выпускаемой продукции и обострение конкурентной борьбы на фармацевтическом рынке стимулирует разработку, создание и постоянное совершенствование упаковочного оборудования, которое удовлетворяет следующим требованиям:

- Микробиологическая стерильность продукта.
- Отсутствие в нём механических загрязнений и пирогенов.
- Экономичное/эффективное производство с низкими эксплуатационными издержками.
- Возможность использования при производстве продуктов массового потребления.

ПРИНЦИП ТЕХНОЛОГИИ

Производство асептической упаковки требует осторожности и особых условий во избежание попадания в раствор микробиологических и других загрязняющих частиц.

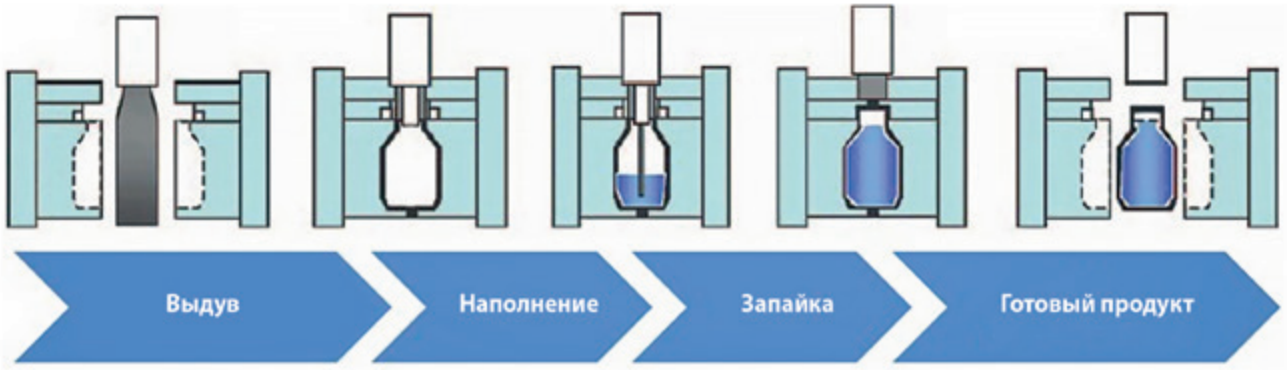


Рисунок 1. Этапы технологии BFS

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Основную угрозу загрязнения парентерального раствора представляют люди, работающие на производстве, поскольку именно они являются источником микрочастиц органического происхождения.

Для обеспечения низкого уровня загрязнения при розливе вблизи открытых контейнеров необходимо соблюдать особую осторожность.

Технология«выдув–наполнение–запаивание»позволяет производить емкость для раствора, заполнять ее и запечатывать, используя одну машину (рисунок 1). Процесс происходит без участия человека, что гарантирует отсутствие контаминации продукта, предоставляя следующие преимущества:

1. BFS-машина занимает меньше места.
2. Обслуживание оборудования требует меньшего числа техников и операторов.
3. Достаточно, чтобы BFS-установка была размещена в комнате с классом чистого помещения D.
4. Технология обеспечивает максимум защиты продукта от возможных загрязнений.
5. Технология освобождает производителя от проблем и затрат, связанных с приобретением и хранением пустых емкостей под розлив продукта.

На рисунке 2 изображены основные этапы процесса расфасовки инфузионных растворов для парентерального применения в установке SYFPAC®.

SYFPAC® является акронимом «System for Filling Parenterals Aseptically into Containers of Plastic materials» (система для заполнения парентеральных растворов в асептической среде в пластмассовые емкости). Эта система специально разработана для решения проблем, связанных с упаковкой парентеральных жидкостей и препаратов для инъекций. Система SYFPAC® основана на технологическом процессе BFS, при ее разработке использовались инновационные идеи, методы инженерного проектирования, а также передовые материалы и технологии. SYFPAC® разработана для надежной и точной работы на протяжении всего длительного срока службы. Простая и надежная конструкция не требует частого технического обслуживания.

BFS: ТЕХНОЛОГИЯ ВЫДУВАНИЯ – НАПОЛНЕНИЯ – ЗАПАИВАНИЯ

BFS-технология используется в фармацевтической промышленности преимущественно для упаковки растворов. Данная технология применима при упаковке таких лекарственных препаратов, как растворы для инъекций, болеутоляющие средства, антибиотики, глазные капли, растворы, вводимые капельным способом, растворы для диализа, растворы для спринцеваний и растворы для гемодиализа. Помимо указанных основных областей применения, эта технология используется для расфасовки свежих фруктовых соков, негазированных напитков, молока и различных косметических продуктов, в том числе кремов.

Первый этап начинается с экструзии паризона – расплавленного рукава из полимерного материала.

Под воздействием вдуваемого воздуха или вакуума (или при комбинации этих двух способов) паризон, принимая форму гнезда пресс-формы, превращается в емкость. Верхняя часть изготовленной емкости открыта и находится в полурасплавленном состоянии до тех пор, пока емкость не будет заполнена и запаяна.

Следующим этапом является наполнение емкости, которое выполняется сверху (верхняя часть пластмассовой емкости все еще находится в полурасплавленном состоянии). Заливочные форсунки входят в верхнюю часть емкости и заполняют ее. Конструкция форсунок упрощает их автоматическую чистку и стерилизацию. Кроме того, форсунки используются для выдувания бутылок и в них предусмотрена отдушина, через которую выходит воздух во время заполнения емкостей. Процесс наполнения может сопровождаться подачей стерильного фильтрованного воздуха, чтобы избежать загрязнения. Воздушный компрессор автоматически регулирует давление подаваемого стерильного воздуха, обеспечивая одинаковую скорость подачи воздуха в разных условиях. Автоматическое устройство управления поддерживает давление потока стерильного воздуха на установленном значении.

На следующем этапе происходит запаивание верхней части сосуда, которая оставалась открытой, пока полимерная масса в этой части находилась в полурасплавленном состоянии. Горлышко сосуда прессу-



Рисунок 2. Основные этапы процесса расфасовки инфузионных растворов для парентерального применения в установке SYFPAC® по технологии BFS

ется головками пресс-форм и одновременно с этим охлаждается, происходит формирование верхней части сосуда. В результате получается герметично закрытый сосуд.

Конечным этапом является удаление облоя с емкости и его вывод из машины. Вся процедура BFS и удаления облоя занимает от 10 до 18 с, в зависимости от типа и размера емкости. Преимуществом технологии BFS является то, что емкость формуется, быстро заполняется и автоматически закупоривается в защищенной среде без участия человека.



Рисунок 3. Автоматизация процессов CIP и SIP, возможность проверки целостности фильтров на месте

Для удаления следов предыдущего продукта перед заполнением нового продукта в системе SYFPAC® используется автоматическая процедура CIP (Cleaning In Place – безразборная мойка). Основными параметрами CIP являются давление, температура и количество циклов мойки, эти параметры можно отрегулировать после проведения соответствующих практических испытаний (рисунок 3). Вдобавок к этому система SYFPAC® может в автоматическом режиме осуществлять процедуру SIP (Sterilisation In Place – безразборная стерилизация) для стерилизации всего контура наполнения, контура сжатого стерильного воздуха, бака с раствором и фильтров. Кроме того, имеется возможность автоматической сушки фильтров и обеспечения стерильности машины посредством нагнетания в контур стерильного сжатого воздуха. Целостность фильтров можно проверить на месте при помощи дополнительного оборудования.

ПРОЦЕДУРА УПАКОВКИ В АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Поскольку процесс выдува, наполнения и запаивания контейнера происходит на одной машине, которая защищается нагнетенным стерильным воздухом, а технологические вещества (воздух, раствор) также, в свою очередь, проходят через стерильную фильтрацию, возможность попадания в раствор загрязняющих частиц практически сведена к нулю. Учитывая тот факт, что во время всего цикла открытая емкость взаимодействует с атмосферой чистой комнаты менее 1,5 с, технология BFS является наилучшим выбором, если вашей главной целью является избежание загрязнений посторонними частицами.

Гибкость в выборе упаковочных материалов

Первичная упаковка (емкость) защищает содержимое от попадания загрязнений из окружающей среды: от микроорганизмов и от посторонних частиц. Кроме того, емкость защищает активное вещество и/или эксципиент от диффузии, обеспечивая стабильность продукта. Кроме того, емкость защищает содержимое от света и газов, присутствующих в окружающей атмосфере.

Помимо этого, необходимо иметь в виду, что раствор соприкасается с имеющимися в пластмассе добавками. В Фармакопее указаны ограничения на содержание добавок в пластмассе, использующейся в медицинских целях, а также перечень добавок, запрещеных к использованию в пластмассе, из которой изготавливаются емкости для фармацевтических продуктов.

Ежедневно многие известные компании производят медицинский полипропилен и полиэтилен, который разрешено использовать при производстве емкостей для внутривенных и инъекционных растворов. Несмотря на то, что емкость, изготовленная при помощи технологии BFS, является стерильной, правила организации производства некоторых стран, а также фармакопеи США и стран Европы предписывают обязательную окончательную стерилизацию продуктов, которые можно подвергнуть стерилизации паром. Европейское медицинское агентство по оценке лекарственных препаратов (EMEA) рекомендует производителям использовать упаковочные материалы, которые можно подвергать окончательной стерилизации, соблюдая указания по температуре и длительности стерилизации.

Ввиду указанных выше причин машины BFS являются лучшим решением для фармацевтической отрасли, поскольку их можно использовать для изготовления емкостей из широкого набора материалов (полиэтилена высокой плотности, полиэтилена низкой плотности, полипропилена).

Это позволяет фармацевтическим компаниям выбрать материал, лучше всего подходящий для конкретного применения или условий. Универсальная конструкция машины SYFPAC® позволяет использовать широкий спектр полимеров без необходимости замены пресс-формы. В машине SYFPAC® можно использовать следующие полимеры:

- Медицинский полиэтилен низкой плотности для экструзии и выдувания LOW DENSITY POLYETHYLENE (LDPE).

- Медицинский полиэтилен высокой плотности для экструзии и выдувания HIGH DENSITYPOLYETHYLENE (LDPE).
- Медицинский полипропилен для экструзии и выдувания POLYPROPYLENE (PP).

Возможность использования пластмасс различных типов упрощает поиск на местном рынке материалов, совместимых с фармацевтическим продуктом, улучшая при этом его стабильность. В экструдер можно установить специальное приспособление, позволяющее добавлять к гранулам определенное количество красителей или специальных добавок перед экструзией, благодаря чему можно изготовлять цветные емкости или емкости, обладающие особыми характеристиками, например блокирующими проникновение ультрафиолетовых лучей и т.д

СПЕЦИАЛЬНАЯ ЗАЩИТНАЯ АТМОСФЕРА И ПРОДУВКА ИНЕРТНЫМИ ГАЗАМИ

Чтобы избежать окисления продукта, пространство над жидкостью можно заполнить инертным газом (азотом, углекислым газом).

Типы емкостей, которые можно производить на BFS-машине

Благодаря универсальному производственному процессу при помощи машины можно изготовить и наполнить разнообразные типы емкостей различных размеров, используя одно из многочисленных решений. Объем емкости может составлять от 0,2 мл до 1 л. Для наглядности размеры емкостей разделены на 3 указанные ниже категории.

Можно изготовлять емкости различных форм, как жесткие, так и гибкие, поддающиеся сжатию сосуды. Как правило, жидкость выпускается через верхнюю часть емкости и для упрощения ее подачи можно изготовить горлышко подходящей формы, в том числе с резьбой для установки соединителей или крышек.

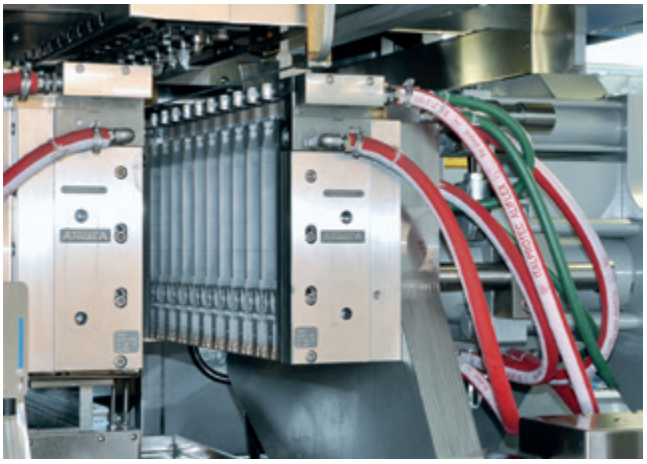


Рисунок 4. Пресс-форма с несколькими ячейками

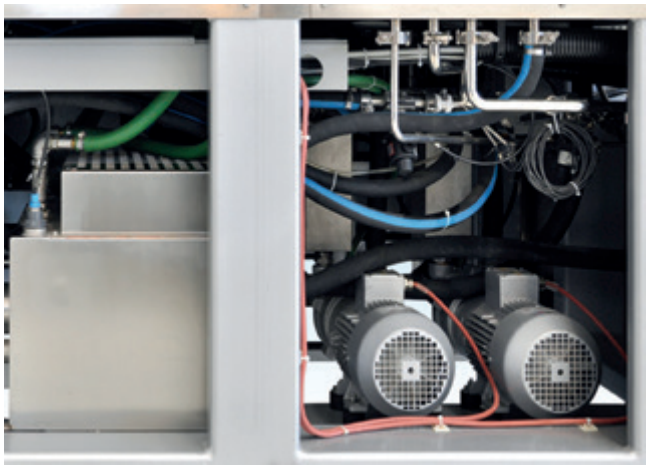


Рисунок 5. Встроенная система вакуума

Пресс-формы

Пресс-формы с несколькими полостями из нержавеющей стали и специальных сплавов бронзы с передовыми охладительными и вакуумными контурами, встроенными в пресс-форму, обеспечивают равномерное производство емкостей (бутылок, ампул, сосудов) [рисунок 4]. На пресс-формы можно наносить градуированную шкалу, указывающую на количество оставшейся жидкости. Кроме того, имеется возможность заказать вставки для рельефной печати номера партии и логотипа компании на поверхности емкостей.

Материалы, из которых изготовлена машина

Тщательный подбор материалов, входящих в контакт с фармацевтическими жидкостями, и самосмазывающиеся детали позволяют использовать машину в чистых комнатах для асептической упаковки и обеспечивают эффективное использование в коррозионной среде. Эргономичная конструкция компонентов обеспечивает простой доступ во время техобслуживания и чистки.

Встроенный генератор вакуума и устройство для снятия облоя

Машины оснащены генератором вакуума и автоматическим устройством для снятия облоя, а гидравлическая система оснащена пропорциональными клапанами управления с электронной регулировкой, обеспечивающими более равномерную работу (рисунок 5).

Панель и интерфейс управления машиной

Система управления осуществляет указанные ниже функции в автоматическом режиме:

1. Осуществление SIP, CIP, сушки фильтра и обеспечение стерильности.

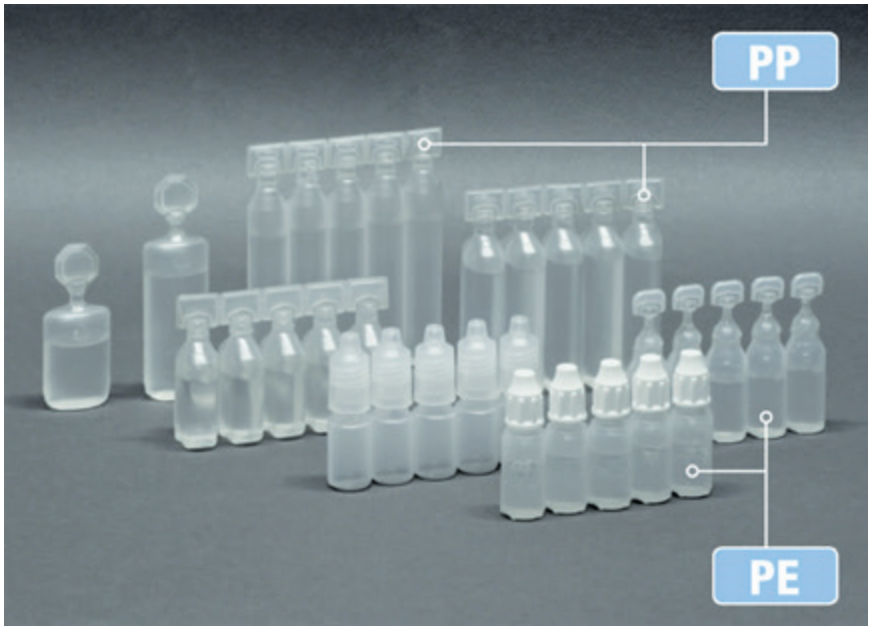


Рисунок 6. Ёмкости для парентеральных растворов малого объёма (Small Volume Parenterals, SVP). Объем наполнения: от 0,2 мл до 50 мл



Рисунок 7. Ёмкости для парентеральных растворов большого объёма (Large Volume Parenterals, LVP). Объем наполнения: от 50 мл до 2500 мл. Тип продуктов: внутривенные растворы

2. Выполнение предварительных операций, необходимых для проверки целостности фильтра.
3. Управление, осуществление и мониторинг всего цикла BFS в автоматическом режиме, снятие облоя и выпуск емкостей.
4. Контроль, мониторинг и управление в ручном режиме.
5. Мониторинг и регистрация критических параметров функционирования машины. В случае, если один из параметров выходит за пределы допустимого диапазона, оператору подается звуковой и визуальный сигнал. Регистрация событий во время работы (архив сигналов тревоги).

Интерфейс для ручного управления состоит из клавиатуры, панели управления и цветного экрана; имеются несколько уровней доступа пользователей.

Интерфейс ручного управления позволяет следующее:

1. Программирование параметров SIP, CIP, контроля целостности фильтра и другие параметры, такие



Рисунок 8. Ёмкости для парентеральных растворов очень большого объёма (Very Large Volume Parenterals, VLVP). Объем наполнения: от 2500 мл

как температура экструдера и время выполнения различных фаз цикла машины. В случае необходимости сотрудники эксплуатационной службы при помощи интерфейса могут задать минимальные/максимальные пороги параметров.

2. Позволяет отображать параметры, необходимые для работы машины.
3. Отображает производственные данные, например часы работы, расход раствора, расход пластмассы и т.д.
4. Отображает критические параметры, например температуру, давление и т.д. во время SIP, CIP и других важных операций по подготовке машины.
5. Позволяет отображать, архивировать и регистрировать аварийные сигналы, как активные, так и возникшие ранее.
6. Дает указания по выполнению определенных работ техобслуживания.
7. Позволяет отображать и устанавливать значения механических параметров, таких как движение пресс-формы (закрытие и перемещение) и ее торможение.

Специальные применения

Технология BFS разработана преимущественно для использования в фармацевтической отрасли, но ее можно использовать также для первичной упаковки следующих продуктов:

- свежие фруктовые соки;
- свежее молоко;
- негазированные напитки;
- косметические продукты.

Жидкости, которые можно упаковывать

Кроме фармацевтических жидкостей, в большинстве случаев являющихся водными растворами, можно установить наполнительные системы для упаковки паст, кремов, суспензий, тиксотропических веществ, быстровысыхающих веществ, требующих защиты от света и от содержащегося в воздухе кислорода, и т.д.

Благодаря технологии BFS конечный продукт обладает следующими свойствами:

- экономичное и эффективное производство;
- отсутствие посторонних частиц;
- микробиологическая стерильность;
- отсутствие загрязнений;
- содержится в требуемой атмосфере.

Дополнительная укупорка при помощи укупорочно-запечатывающей машины MECAS производства Angelo Brevetti

Емкости, изготовленные в машине BFS, герметично запаиваются в стерильных условиях, но при этом для более удобного использования жидких продуктов может потребоваться дополнительная укупорка (например, при помощи колпачка, резинового кольца, переходника и т.д.). Одним из примеров такой укупорки является головка «Euro». Машина MECAS обеспечивает автоматическую сборку, установку и приваривание к горлышку бутылки пробок «Euro».

Помимо пробки «Euro» в наличии имеются различные типы укупорочных приспособлений. Важно выбрать подходящее приспособление, поскольку стоимость дополнительной пробки и резинового кольца может быть сравнительно высокой. В качестве альтернативного решения компания предлагает запатентованную крышку «Ecohead».







powtec
Maschinen und Engineering GmbH

СОВРЕМЕННЫЕ УСТАНОВКИ СУХОЙ ГРАНУЛЯЦИИ – РОЛЛ-КОМПАКТОРЫ

АВТОР

А.М. Гринченко,

руководитель отдела ГЛФ
ГК «Фармконтракт»

ВВЕДЕНИЕ

Все большую и большую популярность набирает метод сухого гранулирования, где основной единицей процесса является система ролл-компактирования.

Современные ролл-компакторы позволяют решать следующие проблемы:

- плохая сыпучесть порошка и проблемы с его дозированием;
- высокое пылеобразование в процессе гранулирования сырья;
- сегрегация порошковой смеси или низкая насыпная плотность.

Данный вид грануляции, конечно же, имеет некоторые ограничения, но в общем обладает рядом преимуществ в сравнении с влажной грануляцией:

1. ***Экономическая составляющая:*** снижаются затраты на подводимые среды, сокращается время технологического процесса, уменьшается количество вспомогательного оборудования (смесители, увлажнители, сушильные установки), а также отсутствует необходимость в использовании вспомогательных материалов для улучшения свойств порошка (например, связующих), которые используются во влажном гранулировании.
2. ***Изменение и точный контроль характеристик продукта:*** контролируется и настраивается размер гранул, их насыпная плотность, а также насыпная плотность и сыпучесть итогового продукта.
3. ***Экологически чистый продукт:*** при помощи грануляции возможно увеличить плотность сырья и его содержание на единицу объема, минимизировать пылеобразование, избежать перекрестного загрязнения и потерь продукта.
4. ***Экономия занимаемой рабочей площади и высокое качество:*** все ролл-компакторы позволяют существенно сэкономить занимаемое пространство и выполнены из нержавеющей стали.
5. ***Легкость в обслуживании и очистке:*** ввиду снижения общего количества единиц оборудования снижаются временные затраты на их обслуживание и очистку, помимо этого ролл-компакторы имеют простую и эргономическую конструкцию.
6. ***Надежность:*** конструкция роликов рассчитана на высокие нагрузки в процессе прессования и выполнена с учетом возможных перегрузок, вызванных перегревом, неправильным использованием и другими факторами в процессе непрерывной работы при серийном производстве.
7. ***Снижение объема инвестиций:*** за счет большинства преимуществ снижаются трудозатраты и, как следствие, себестоимость продукта, при том что изначальные инвестиции в процесс сухой грануляции будут ниже, чем влажной.

Далее рассмотрим конструкцию современного ролл-компактора на примере модели RC170 немецкого производителя Powtec (рисунок 1).

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ПРИНЦИП РАБОТЫ РОЛЛ-КОМПАКТОРА

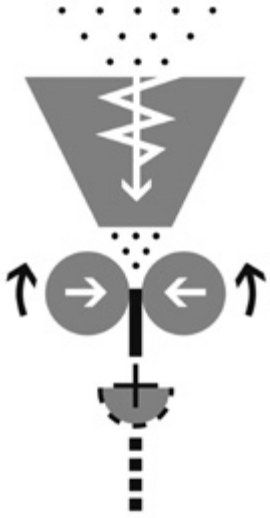


Рисунок 1. Схематическое изображение принципа работы ролл-компактора

Ролл-компактор имеет принудительную подачу сырья на два ролика, вращающихся навстречу друг другу, и прессует исходное сырье в гранулы, брикеты или пластины. После этого готовые брикеты измельчаются в гранулы с помощью мельниц и фракционируются просеиванием.

Порошок, подлежащий гранулированию, подают в питающий бункер. Этот бункер оснащен шнековым питателем и мешалкой. Вертикальный шнековый питатель подает продукт в область прессования или компактирования (между двумя роликами). Благодаря своей конструкции, шнек уплотняет и деаэрирует сырье. Скорость питателя зависит напрямую от зазора между роликами компактора и влияет на общую производительность компактирования. Зазор между роликами контролируется и регулируется.

Время компактирования или прессования брикетов (пластин) зависит также от скорости вращения роликов. Необходимое давление компактирования сообщается непосредственно роликам с помощью гидравлической системы.

Ролики установлены между двумя узлами с подшипниками, при этом при замене роликов подшипники не нуждаются в демонтаже. Преимуществами этого узла являются быстрое время замены роликов, легкость в обслуживании и очистке (рисунок 2). При этом ролики остаются параллельными при компактировании, даже если сырье прессуется под очень высоким давлением.

Гранулы, брикеты или спрессованная масса измельчаются мельницами и фракционируются просеиванием с отверстиями под необходимый конечный размер гранул. Полупродукты подаются очень бережно, чтобы избежать появления мелких частиц. Пылевая фракция в грануляте может быть отделена устройством разделения фракций и отправлена с помощью вакуумной системы загрузки на повторную переработку.

Узел управления с цифровым дисплеем для индикации скорости и нагрузки на шнековый питатель, ролики и мельницы, а также гидравлического давления позволяет оператору контролировать все необходимые параметры процесса.

СИСТЕМА РОЛЛ-КОМПАКТОРОВАНИЯ/ ГРАНУЛЯЦИИ, МОДЕЛЬ RC170 PHARMA

Данная система предназначена для компактирования сухих, порошкообразных материалов с последующим измельчением. Модель выполнена для фармацевтического производства. Следовательно, все контактирующие с продуктом части выполнены из нержавеющей стали DIN 1.4404 (AISI 316L) и/или DIN 1.4571 (AISI 316TI) с соответствующей обработкой и отполированы с шероховатостью Ra≤0,8 мкм. Другие сварные конструкции системы, такие как рама и обшивка, выполнены из нержавеющей стали марки DIN 1.4571 (AISI 316TI) или DIN 1.4301 (AISI 304).

СОСТАВЛЯЮЩИЕ ЧАСТИ СИСТЕМЫ РОЛЛ-КОМПАКТИРОВАНИЯ

Ролл-компактор

Узел подачи продукта состоит из бункера и интегрированного шнекового питателя с мешалкой. Доступны различные системы и формы шнека и мешалки в зависимости от продукта. Оператор имеет возможность регулировки скорости подачи продукта посредством управления частотным регулятором



Рисунок 2. Конструкция камеры компактирования и принцип замены роликов



Рисунок 3. Общий вид системы сбоку

привода шнека. Бункер с системой подачи сырья легко демонтируется для очистки и обслуживания. Двигатель обшит нержавеющей сталью (рисунок 3).

Данный ролл-компактор выполнен в горизонтальном исполнении. Инновационная система демонтажа ролика гарантирует быструю и простую замену. Область компактирования (в зоне прессования) герметизируется сверху и по бокам при помощи специальных уплотнений, которые предотвращают потерю сырья (рисунок 4).

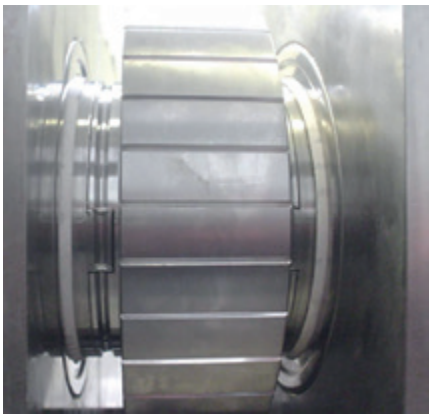


Рисунок 4. Герметизация камеры компактирования

Производительность зависит от многих факторов и может регулироваться. Диаметр ролика и его длина зависят от выбора конкретной модели и желаемой производительности. Ролики выполняются из нержавеющей стали DIN 1.4404 (AISI 316L). Ролики имеют регулируемый зазор между поверхностями (до 5 мм) [рисунок 5]. Поверхности роликов выбираются в зависимости от поставленной задачи и характеристик исходного сырья. Они могут быть гладкими, рифленными, гофрированными, а также предназначенными и для брикетирования. На рисунке 6 приведены примеры исполнения различных поверхностей. Скорость вращения роликов изменяемая. При этом стоит отметить, что выбор скорости подачи сырья – очень важный параметр. При очень низкой скорости страдают характеристики продукта, очень высокая скорость может нанести механические повреждения роликам.

Положение роликов может регулироваться при помощи гидравлических приводов, при этом изменяется усилие прессования. Скорость роликов также изменяется.



Рисунок 5. Фотография роликов с различными поверхностями

Роторные мельницы для измельчения с последующим фракционированием продукта

Система состоит из двух высокопроизводительных мельниц с просеиванием для измельчения и грануляции. Измельчающий ротор размалывает и затем продавливает продукт через сита или перфорированную пластину (рисунок 7). Первый ротор мельницы уменьшает размеры продукта после компактирования. Второй узел оснащен ситом с ячейками размером, соответствующим требуемому максимальному размеру гранул на выходе. Диаметры сит и скорости мельниц определяют итоговую производительность. Расстояние между ситами и измельчающим ротором легко настраивается для различных типов продуктов.

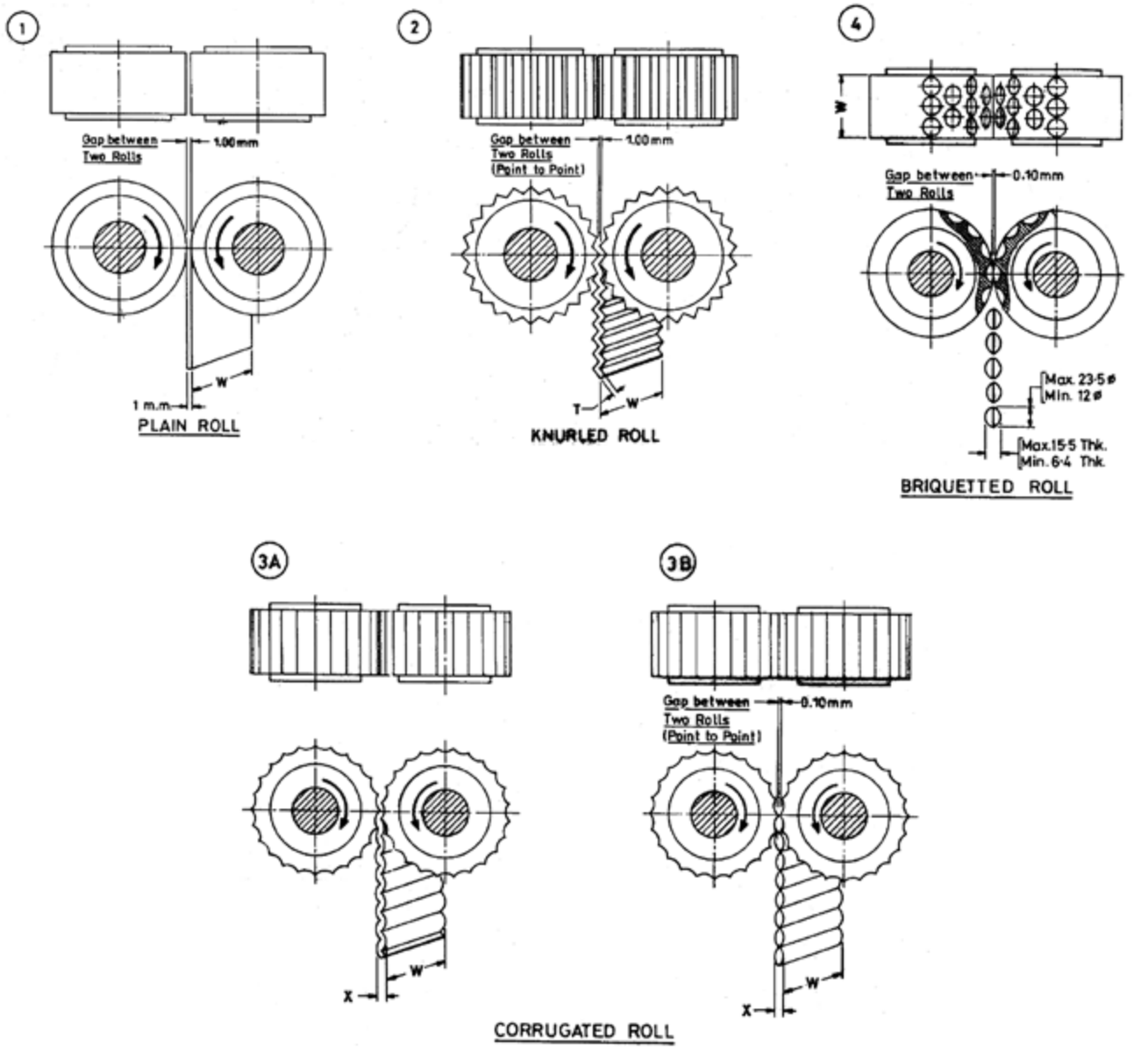


Рисунок 6. Изображение внешнего вида и принципа работы роликов ролл-компактора с различными поверхностями: 1) гладкими, 2) гофрированными, 3А и 3В) рифленные ролики для различных пластин и усилий, 4) для получения индивидуальных гранул

Ротор консольного типа обшит сварным пылезащищенным кожухом. Ротор и сита имеют удобный доступ для демонтажа, очистки и обслуживания, путем открытия передней панели. Двигатель ротора закрыт обшивкой из нержавеющей стали. Доступны сита различного размера.

Система управления

Шкаф управления со всеми элементами управления и индикаторами для мониторинга и контроля за процессом является частью системы. Система управления имеет ряд блокировок во избежание неправильной последовательности включения роторов, компактирования, питателя и проч. Шкаф управления содержит электроподключения, частотные преобразователи, предохранители, выключатели, контакторы, трансформаторы, системы защиты (аварий) всех приводов, которые необходимы в процессе эксплуатации. Система управления комплектна, смонтирована, подключена и готова к работе.

Основные блоки:

1. Основной выключатель, кнопка аварийной остановки, индикаторы работы и аварий.
2. Пуск/стоп для роторов измельчителей, ролл-компактора, шнекового питателя с мешалкой и гидравлической системы.

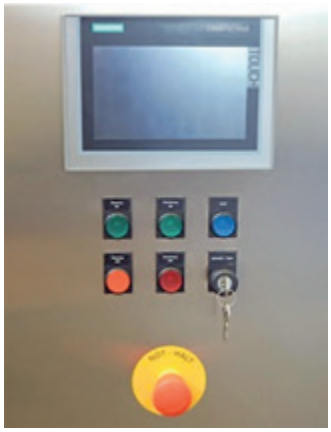


Рисунок 7. **Узел измельчения ролл-компактора**

3. Потенциометр для регулировки скорости ротора измельчителя, ролл-компактора, шнекового питателя.
4. Цифровой дисплей для отображения скорости и нагрузки двигателя шнекового питателя, ролл-компакторов и роторов мельниц, а также для гидравлики.



Также система управления может быть выполнена с графическим интерфейсом.



В таком случае все функции контроля и управления, а также мониторинга будут реализованы посредством программного обеспечения и графического интерфейса на базе сенсорного экрана управления.

Управление HMI

HMI (интерфейс «человек-машина») поставляется в комплекте с сенсорным экраном управления и позволяет производить управление в автоматическом и ручном режимах, с многоуровневым ограничением прав доступа.

Полуавтоматический режим	Используется для нового продукта и установки всех значений и пределов
Автоматический режим	Полностью автоматическое управление, после введения кода, система автоматически запускается с предсохранёнными значениями и пределами и осуществляет мониторинг безопасной и качественной работы
Объем памяти	32 кБт, ориент. 100 продуктов

Подъемное устройство шнека и мешалки

Подъемное устройство разработано с учетом быстрой и легкой очистки и обслуживания шнекового питателя и мешалки. Мешалка и шнековый питатель в сборе с двигателем и конвейером могут быть подняты в полуавтоматическом режиме при помощи пневматической системы и повернуты после ослабления четырех креплений без специального инструмента (рисунок 8). На крышке бункера установлен датчик аварийной остановки. Для работы пневматической системы необходимо подавать сжатый воздух под давлением 6 бар.

Винтовая ленточная мешалка (Band screw stirrer)

Винтовая ленточная мешалка предназначена для обеспечения наполнения шнека питателя при ис-



Рисунок 8. Подъемное устройство в верхнем положении шнека и мешалки

пользовании легких порошков (с насыпной плотностью меньше 0,4 г/см^3). Данная мешалка уплотняет материал, подавая его к шнеку питателя, таким образом устраняя наслаивание продукта и его залипание на поверхности бункера, предварительно осуществляя прекомпактирование и деаэрацию материала для правильной качественной подачи посредством питающего шнека. Мешалка выполнена из нержавеющей стали.

Датчик уровня



Рисунок 9. Датчик уровня бункера

Датчик уровня установлен на крышке бункера для контроля уровня наполнения. Датчик определяет максимальный уровень продукта и передает сигнал на управляющее реле. Реле в свою очередь управляет внешним устройством наполнения бункера сырьем – вакуумным загрузчиком (3.2.9). Датчик уровня выполнен из нержавеющей стали 1.4571 (AISI 316Ti).

Система водяного охлаждения роликов

Устройство водяного охлаждения роликов предотвращает недопустимое повышение температуры во время процесса компактирования. Охлаждающая вода подается через 1/2″ соединения, на каждый вал роликов и внутрь. Отработанная вода поступает в сливной коллектор через такое же соединение в 1/2″.

Требования к охлаждающей воде: примерно 6 л/мин с ориентировочным давлением 3 бара (44 фунтов на квадратный дюйм), необходимая температура носителя зависит от степени чувствительности продукта (сырья) к нагреванию и максимальному значению температуры.

Вибросито с вакуумным загрузчиком



Рисунок 10. Ролл-компактор с вакуумным загрузчиком и виброситом

Вибросито используется для разделения мелкодисперсных и не соответствующих требуемому размеру гранул. В процессе компактирования невозможно избежать попадания мелкодисперсных частиц в готовые гранулы, потому что часть порошка пройдет мимо

узла компактирования, а часть этого порошка будет слишком измельчена в мельнице. Даже если конструкция машины предусматривает предотвращение и минимизацию этой проблемы, будет попадаться часть мелкодисперсных гранул и это будет происходить в любой машине любого производителя.

Конструкция ролл-компактора с виброситом имеет преимущество в решении этой проблемы. Желаемый размер гранул и количество мелкодисперсных частиц может жестко контролироваться и регулироваться.

В комплект поставки включается вибросито с обшивкой, сита, гибкие продуктопроводы, комплект для очистки (самоочистки) из полиуретановых скребков, все необходимые заслонки, отдельная рама и синхронизация с системой управления ролл компактором. Все контактирующие части будут выполнены из нержавеющей стали с должной степенью обработки поверхности.

Система вакуумной загрузки/подачи продукта состоит из двух загрузчиков (рисунок 12). Одна система подает сырье в бункер, вторая система подает готовые гранулы и порошок в вибросито. Мелкодисперсные и несоответствующие размеру гранулы подаются обратно в питатель ролл-компактора. Общая производительность системы порядка 150 кг/ч.

Вакуумный насос создает необходимый уровень разряжения. Сырье автоматически будет поступать в бункер подачи. Система загрузки синхронизирована с системой управления ролл-компактора; она выполнена из нержавеющей стали. Данная установка потребует подключения сжатого воздуха (без масла и содержания влаги) с давлением 6 бар.



Рисунок 11. Система вакуумной загрузки

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные системы сухой грануляции, принцип работы которых основан на ролл-компакторах, – сложные автоматические системы, позволяющие существенно снизить себестоимость продукта, улучшить его качество и снизить трудозатраты при его производстве. Данные системы находят все большее применение не только в фармацевтической промышленности, но и в химии, пищевой, строительной и косметической промышленности.

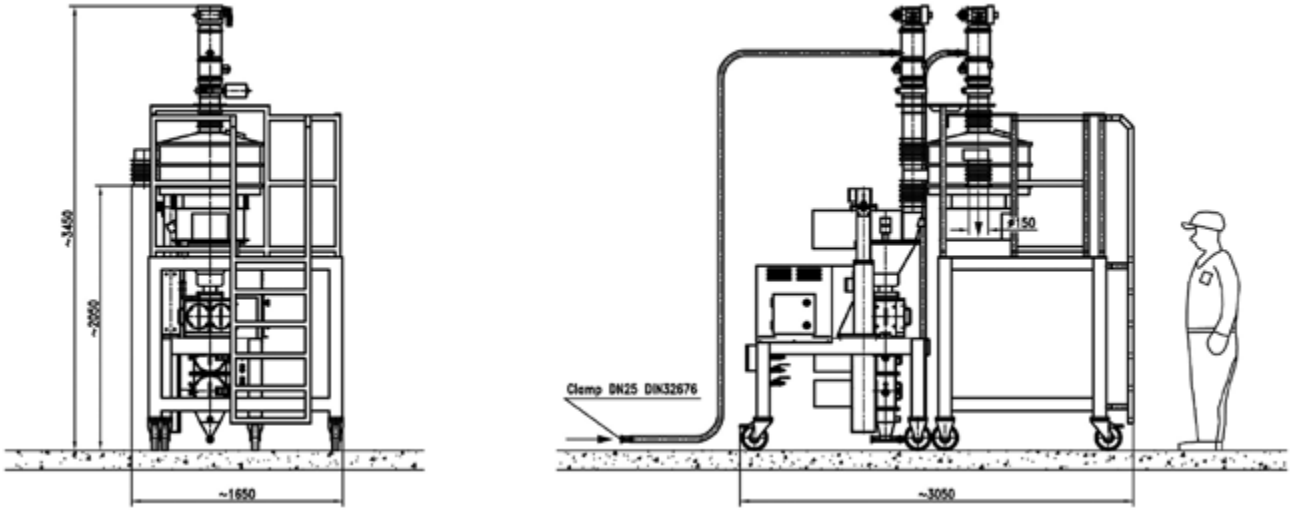


Рисунок 12. Чертеж ролл-компактора с системой вакуумной загрузки и виброситом

ИСПЫТАНИЯ ГЕРМЕТИЧНОСТИ УКУПОРКИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО НАПОЛНЕННЫХ ШПРИЦЕВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕРАЗРУШАЮЩЕГО МЕТОДА СНИЖЕНИЯ ВАКУУМА

АВТОР

Андреа Симонетти (Andrea Simonetti),

руководитель направления стратегических инициатив, Bonfiglioli Engineering S.r.l., TASI Group, Италия

Перевод: М.А. Брыкина,

менеджер по продвижению ГК «Фармконтракт»

СОВРЕМЕННЫЕ ПРАКТИКИ, ВЫЗОВЫ И НОВЫЕ РАЗРАБОТКИ

В настоящее время все большую популярность при производстве биофармацевтических препаратов получают предварительно наполненные шприцы (PFS). Развитие рынка в этом направлении обусловлено рядом причин, среди которых удобство введения лекарственного препарата в организм, высокая степень безопасности и низкий уровень риска контаминации и ошибки. Одной из ключевых задач контроля качества шприцев PFS является обеспечение герметичности укупорки после розлива и стерилизации. Негерметичный шприц PFS может привести к негативным воздействиям на лекарственный препарат. В настоящей статье рассматривается технология валидации неразрушающего метода контроля герметичности (CCI), которая позволяет работать в том числе со шприцами PFS. Испытания проводились согласно указаниям ASTM F2338 (признанный консенсусный стандарт FDA целостности фармацевтической упаковки). Во всех CCI испытаниях применялась однопозиционная полуавтоматическая машина проверки на герметичность LF-S (Bonfiglioli Engineering, г. Феррара, Италия) с инновационной системой предотвращения возможных движений поршней шприцев PFS. Специально подобранные испытуемые образцы шприцев применялись для определения способности обнаружения протечек, среднеквадратического отклонения процесса и индикаторов эффективности испытаний. Результаты исследования на основе метода снижения вакуума (VDM) показали эффективность использования оборудования LF-S для определения точек протечки шприцев PFS диаметром менее 5,0 мкм.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ПРИМЕР ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

В данном практическом примере исследуется способность оборудования LF-S определять наличие смоделированных дефектов различного размера и типа на шприцах PFS и вычислять процент получения недостоверных результатов.

Были определены следующие индикаторы метода VDM:

- положительная вероятность обнаружения (DR_{PC});
- отрицательная вероятность обнаружения (DR_{NC}).

Также были вычислены:

- относительное число ложно негативных срабатываний FNR = 1 – DR_{PC};
- относительное число ложно позитивных срабатываний FPR = 1 – DR_{NC}.

ПОДГОТОВКА ИСПЫТУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

В качестве объекта исследования был выбран набор стеклянных шприцев с пластмассовыми наконечниками Луера и резиновыми поршнями (рисунок 1). Испытуемые образцы были подготовлены согласно следующим критериям:

- группа отрицательного контроля шприцев PFS, без утечек;
- группа положительного контроля шприцев PFS, с искусственно созданными дефектами, таком же количестве.

Исследование было организовано как цикл со следующими двумя условиями:

1. Шприцы PFS с лекарственным препаратом (уровень заполнения 0,4 мл).
2. Шприцы PFS со стерилизованной водой (уровень заполнения 0,4 мл).

Данный подход обусловлен необходимостью получения качественного соотношения испарительной способности лекарственного препарата / стерилизованной воды.

ГРУППА ОТРИЦАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ

Было отобрано 60 подходящих шприцев PFS из начального комплекта с последующим проведением микробиологического теста, методика которого основана на погружении заполненных триптическим соевым бульоном шприцев PFS в бактериальную суспензию (раствор с *Brevundimonas diminuta*). Далее все шприцы PFS очищали, а затем инкубировали в течение 7 дней при температуре от 25 °C до 30 °C. Шприцы PFS без какого-либо роста микроорганизмов после инкубирования были включены в группу отрицательного контроля.



Рисунок 1. Предварительно наполненный шприц (PFS): вид фармацевтической упаковки, используемый во время исследования

Таблица 1.

Характеристики отверстий, полученных лазерной пробивкой

Диаметр отверстий (мкм)	Положение: A = выше уровня заполнения; B = ниже уровня заполнения	Порядковый номер	Расход ($см^3$/мин)	Количество
5	B	1–10	0,213	10
5	A	11–20		10
10	B	21–30	0,855	10
10	A	31–40		10
20	B	41–50	3,41	10
20	A	51–60		10

Таблица 2.

Характеристики капиллярных трубок

Соответствующий диаметр отверстия (мкм)	Капиллярные трубки		Расход ($см^3$/мин)	Количество
	Длина (мм)	Диаметр (мкм)		
5	9	25	0,213	20
10	13	40	0,855	20
20	28	75	3,41	20

ГРУППА ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ

Отверстия, полученные лазерной пробивкой

С помощью лазерной пробивки цилиндров шприцев PFS (рисунок 2) были получены отверстия размером от 5 мкм до 20 мкм (таблица 1), расположенные выше (положение «A») и ниже (положение «B») уровня заполнения. Минимальный размер отверстия был установлен согласно стандарту ASTM F2338; определение возможного предела обнаружения утечек не являлось целью.

Все образцы шприцев PFS были пронумерованы от 1 до 60. В соответствие с предполагаемым уровнем вакуума последующих VDM-испытаний был установлен перепад давления 980 мбар в местах утечки шприцев PFS. Допуски диаметра отверстий приведены в свидетельстве о поверке: (5 мкм ±2 мкм), (10 мкм ±3 мкм), (20 мкм ±5 мкм). В частности, фактический размер отверстий 3 образцов из 10 в группе шприцев с отверстиями диаметром 5 мкм положения «B» составлял менее 3,5 мкм.

Капиллярные трубки

Второй комплект забракованных шприцев PFS был укомплектован вставляемыми в поршень шприца керамическими капиллярными трубками для локализации внешних утечек (таблица 2). Длина и диаметр капиллярных трубок специально подбирались для получения того же расхода, что и в группе с отверстиями лазерной пробивки, с перепадом давления по местам утечки 980 мбар.

Капиллярные трубки (рисунок 3) размещали таким образом, чтобы уровень утечек был ниже (10 шт., положение «B») и выше (10 шт., положение «A») уровня заполнения. После заполнения стерилизованной водой и лекарственным препаратом шприцы PFS со встроенными капиллярными трубками использовали для сравнения со шприцами PFS с отверстиями лазерной пробивки.

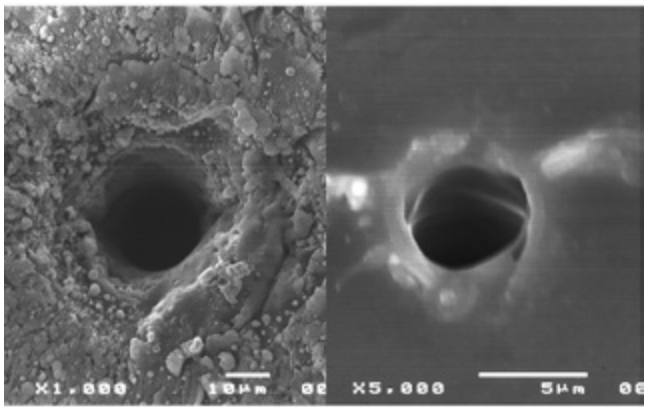


Рисунок 2. Отверстия, полученные лазерной пробивкой. На рисунке слева показано отверстие диаметром 20 мкм с внутренней стороны шприца PFS; на рисунке справа показано отверстие диаметром 5 мкм с внешней стороны шприца PFS

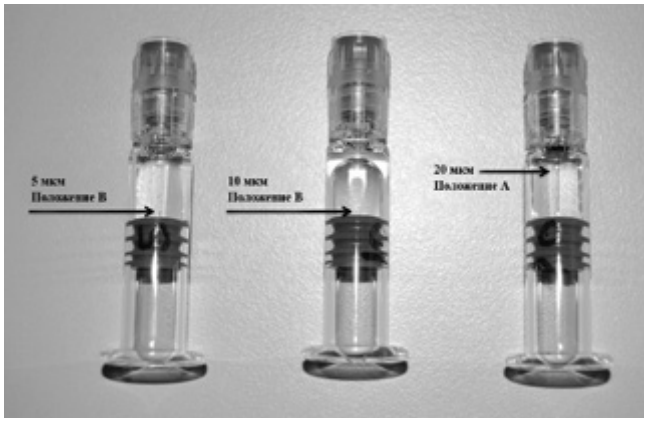


Рисунок 3. Подготовка капиллярных трубок

Для каждого шприца проводилась следующая процедура:

1. Определялся диаметр и длина трубки, позволяющие получить требуемый расход и рекомендуемый перепад давления в 980 мбар между входом и выходом трубки.
2. Трубки отрезались перпендикулярно выбранной длине.
3. Устанавливался рекомендуемый перепад давления между входом и выходом трубки и затем измерялся расход между ними.
4. Трубка помещалась в иглу, которая вставлялась в поршень шприца; положение трубки регулировалось в соответствии с требуемой высотой, после чего игла полностью вытаскивалась из поршня.

VDM (ASTM F2338)

Описание метода испытания

VDM – это неразрушающий метод CCI-испытаний, применимый к большинству видов фармацевтической упаковки. CCI-испытания шприцев PFS проводят внут-

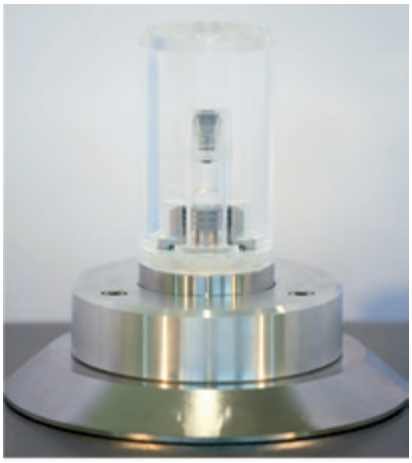


Рисунок 4. **Испытательная камера оборудования LF-S**

ри герметичной испытательной камеры (рисунок 4). Метод VDM заключается в следующем: внутри испытательной камеры создается вакуум, вызывающий перепад давления между внутренней и внешней средой шприца PFS. Воздух движется из области высокого давления (внутри шприца PFS) в область низкого давления (снаружи шприца PFS), вызывая постепенное повышение давления (понижение вакуума) снаружи шприца PFS. Повышение давления также может быть вызвано испарением жидкого продукта, закупоривающего места утечки. Превышение уровня давления сверх установленных порогов после завершения испытаний сигнализирует о наличие утечек у шприца PFS.

Метод VDM включает в себя следующие этапы (рисунок 5):

- вакуумирование: создание вакуума внутри испытательной камеры;
- стабилизация: время, необходимое для равномерного распределения вакуума;
- испытание: при постоянном контроле уровня вакуума с помощью специального датчика проводятся два измерения вакуума: в начале (1-е снятие показаний) и в конце (2-е снятие показаний).

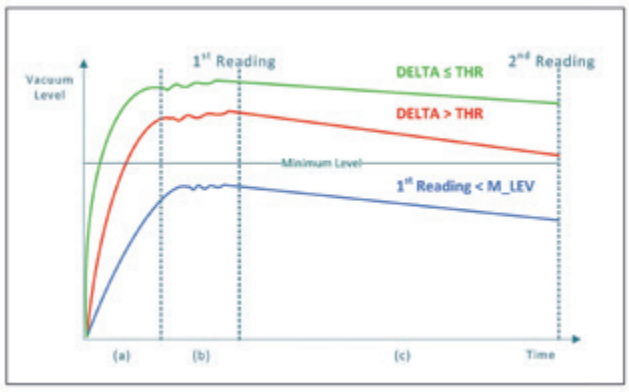


Рисунок 5. **Кривые вакуума во время выполнения процесса испытания VDM**

Результаты получают на основе сравнения уровня снижения вакуума «Δ» (Δ = 1-е показание – 2-е показание) с предварительно установленным порогом THR:

- если Δ ≤ THR, шприц PFS классифицируется как соответствующий (утечек не обнаружено);
- если Δ > THR, шприц PFS классифицируется как дефектный (обнаружены утечки микроразмера).

СТЕРИЛЬНОСТЬ ПРОДУКТА

Перепад давления во время вакуумирования может вызвать нежелательное перемещение поршня шприца PFS, который при устранении разницы давлений после завершения испытания возвращается в исходную позицию.

Такое перемещение поршня может вызвать попадание примесей и контаминацию лекарственного препарата. Шприцы PFS, как и другие упаковки для препаратов парентерального применения, должны обеспечивать устойчивость и стерильность готовой лекарственной формы в течение всего срока хранения. Поэтому любые потенциально возможные перемещения поршня должны быть исключены.

ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Во время исследования использовалась однопозиционная полуавтоматическая машина проверки на герметичность LF-S – оборудование лабораторного типа, позволяющее проводить испытание шприцев PFS с использованием методики VDM (рисунок 6). Установленная на корпусе LF-S испытательная камера имеет следующую конструкцию:

- зафиксированная нижняя часть, соединенная с пневмоприводами и вакуумным датчиком;
- съемная верхняя часть, необходимая для закупоривания испытательной камеры перед началом испытательного цикла.

Зафиксированная нижняя часть испытательной камеры оборудована мобильным «устройством торможения поршня» (Plunger Stopping Device, PSD), вертикально перемещающимся между двумя крайними положениями («верхнее» и «нижнее») и имеющим секцию размером, эквивалентным поршню шприца PFS.

Съемная верхняя часть испытательной камеры выполнена из поликарбоната для удобного обзора перемещений поршней шприцев PFS во время испытательного цикла. При создании вакуума в испытательной камере во время этапа A (рисунок 5) устройство PSD постепенно движется вверх, соприкасаясь поршнем шприца PFS («верхнее» положение) с усилием, равным по абсолютной величине и противоположным по направлению усилию самого поршня. Это «верхнее» положение сохраняется до снятия 2-го показания; после этого специальный пневматический привод обеспечивает создание вакуума в нижней части

испытательной камеры и опускает устройство PSD до положения «нижнее».

В результате поршень шприца PFS сохраняет исходное положение в течение всего испытательного цикла VDM. Важно отметить, что эта система позволяет проводить испытания CCI на основе метода VDM, не вызывая какого либо негативного влияния на стерильность и безопасность продукта:

1. Зеленая кривая: шприцы PFS, соответствующие требованиям герметичности (без утечек).
2. Красная кривая: шприцы PFS с дефектом (небольшое отклонение герметичности закрытия).
3. Синяя кривая: шприцы PFS с дефектом (сильное отклонение герметичности закрытия).
4. Отверстия лазерной пробивки размером 5/10/20 мкм («Hole»), находящиеся в условиях воздействия лекарственного препарата.
5. Капиллярные трубки («CT») 5/10/20 мкм в положении B.



Рисунок 6. **Оборудование LF-S**

Таблица 3.

Параметры настройки оборудования LF-S

Наименование параметра	Величина	Единица измерения
Вакуумирование	0,50	с
Стабилизация / снятие первого показания	0,25	с
Снятие двух показаний	5,0	с
THR	6,82	мбар
M_LEV	986,50	мбар

Таблица 4.

Результаты испытаний VDM (ASTM F2338)

Комплект испытуемых образцов	Диаметр отверстий (мкм)	DR (%)	FNR (%)	FPR (%)
Положительный контроль	5 мкм	100,00%	0,00%	–
	10 мкм	100,00%	0,00%	–
	20 мкм	100,00%	0,00%	–
Отрицательный контроль	–	100,00%	–	0,00%

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для настройки оборудования использовались параметры, приведенные в таблице 3. Образцы испытывались пятнадцать раз. Были получены первые показания и Δ результирующих первоначальных данных, вычислены средние значения среднеквадратические отклонения. Критерий согласия Колмогорова – Смирнова с учетом среднеквадратических отклонений процесса подтвердил соответствие первоначальных данных. Далее в процентном отношении структурировались итоговые данные (таблица 4):

- Положительный контроль, при котором методом VDM были получены положительные результаты (DR_{PC}).
- Отрицательный контроль, при котором методом VDM были получены отрицательные результаты (DR_{NC}).

Также были отражены значения FNR и FPR.

В группе положительного контроля при испытании шприцев, заполненных лекарственным препаратом, наблюдалось меньшее снижение вакуума, чем при испытании шприцев, заполненных стерилизованной водой (рисунок 7), что связано с небольшим снижением испарительной способности. Следует отметить, что в самом сложном случае (шприцы PFS с лекарственным препаратом) в группе положительного контроля уровень среднеквадратического отклонения был превышен в 7,2 раза, как следствие, демонстрировалась пренебрежительно малая возможность получения ложных результатов. В группе положительного контроля с отверстиями позиции A наблюдалось увеличение диапазона отклонения (рисунок 8). Это подтверждает, что отверстия лазерной пробивки,

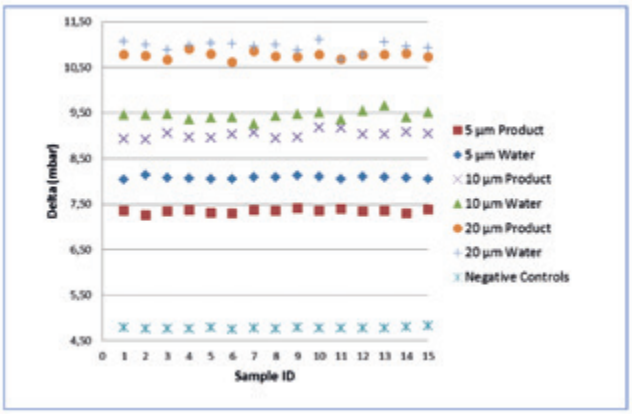


Рисунок 7. Сравнение отрицательного и положительного контроля (Положение B): Результаты VDM-испытаний для групп отрицательного и положительного контроля (с отверстиями лазерной пробивки диаметром 5/10/20 мкм, подверженных воздействию стерилизованной воды «Water» и лекарственного препарата «Product»). При каждой репликации по оси x средняя величина снижения вакуума Delta наносится на ось y. Средние значения Delta вычисляются на основе 10 образцов как указано в таблице 1

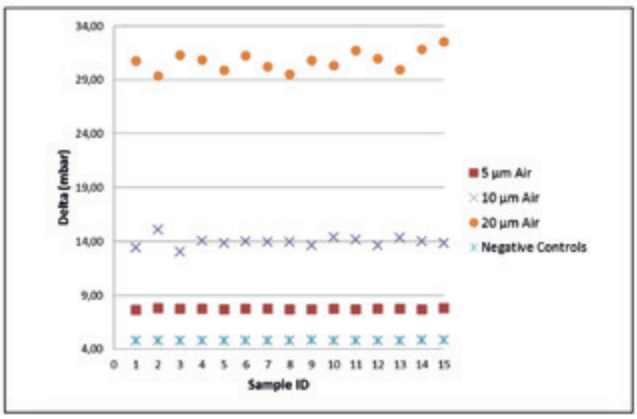


Рисунок 8. Сравнение отрицательного и положительного контроля (Положение A): Результаты VDM-испытаний для групп отрицательного и положительного контроля (с отверстиями лазерной пробивки диаметром 5/10/20 мкм, подверженных воздействию воздуха «Air»). В этом исследовании группа положительного контроля была заполнена лекарственным препаратом

находящиеся в контакте с воздухом, приводят к прогнозируемому, более значительному снижению вакуума, вызванному небольшой плотностью воздуха по сравнению с плотностью лекарственного препарата / стерилизованной воды.

Сравнение отверстий лазерной пробивки и капиллярных трубок

Выявлена превосходная корреляция (разница значений снижения вакуума меньше 0,2%) между отверстиями лазерной пробивки и капиллярными трубками в группе 5 мкм (рисунок 9), не зависящая от того, подвергалось ли отверстие воздействию стерилизованной воды, лекарственного препарата (положение

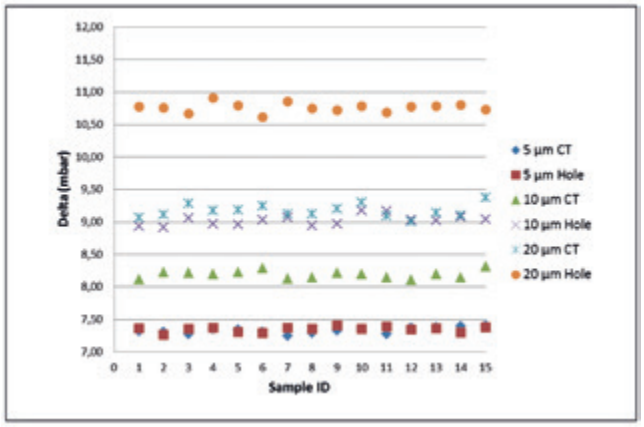


Рисунок 9. Сравнение результатов VDM-испытаний для групп положительного контроля

«B») или воздуха (положение «A»). Можно сделать вывод, что две различные методики, разработанные для проведения положительного контроля, предоставляют сходные результаты даже в случае возникновения утечек в двух каналах с различной длиной и диаметром (таблицы 1, 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило улучшить понимание специфики внедрения неразрушающих методов CCI-испытаний для обеспечения целостности и исправности шприцев PFS.

Исследование проводилось с использованием специально отобранных стеклянных шприцев с выявленным браком (рисунок 10), заполненных вакциной и стерилизованной водой. Была получена информация о способности обнаружения образцов с известными дефектами и определен процент ложных результатов. Результаты, приведенные в таблице 4, подчеркивают несомненные преимущества метода VDM, который в сочетании с инновационной системой предотвращения перемещения поршня шприца PFS во время CCI-испытаний доказывает свою эффективность.



Рисунок 10. Полный набор используемых для исследования предварительно наполненных шприцев PFS с отверстиями лазерной пробивки

УСТРОЙСТВА ПРОБООТБОРА ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИКИ ОТ BÜRKLE

АВТОР

В. Степанов,

менеджер по работе с клиентами,
Bürkle Россия / СНГ

Перевод: М.А. Брыкина,

менеджер по продвижению
ГК «Фармконтракт»

ВВЕДЕНИЕ

При отборе проб в фармацевтической отрасли важно, чтобы пробоотборники были изготовлены из высококачественных материалов, с отличными характеристиками поверхности, с обработкой, гарантирующей отсутствие вырезов и щелей, в которых могли бы собираться остатки проб. Это единственный способ избежать загрязнения отобранных проб.

В данной статье будут рассмотрены пробоотборники Bürkle, полностью отвечающие требованиям фармацевтического производства, многие из них соответствуют нормативам FDA или GMP.

ЗОНАЛЬНЫЕ ПРОБООТБОРНИКИ

Зональные пробоотборники Bürkle предназначены для отбора проб из сыпучих грузов любого вида. Преимущество зональных пробоотборников состоит в том, что они обеспечивают многоуровневый отбор проб из всех слоев тары. С помощью просекателей возможен отбор проб из самых различных сыпучих грузов.

Пробоотборник All-Layer-Sampler, имеющий конструкцию с открытой внутренней трубкой, без раздельных камер, с большим цилиндром для сбора образцов, оптимален для многоуровневого пробоотбора из всех слоев анализируемого материала.

Для точечного пробоотбора с заранее определенной глубины разработан **пробоотборник Uno-Sampler** из нержавеющей стали V4A/ПТФЭ с раздельной камерой.

Для многократных точечных пробоотборов с различных, заранее означенных глубин может применяться **пробоотборник Multi-Sampler** с несколькими раздельными камерами (рисунок 1, таблица 1).



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

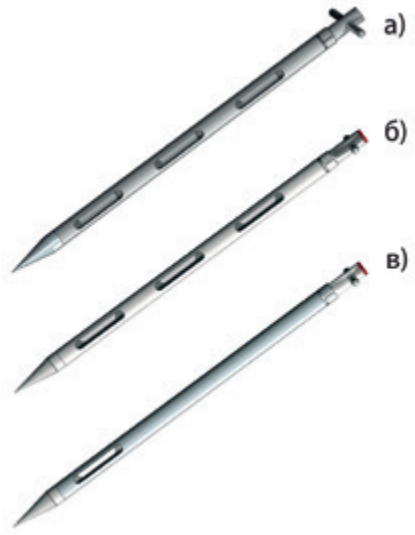


Рисунок 1. Зональные пробоотборники: а) All-Layer-Sampler, б) Multi-Sampler, в) Uno-Sampler

Таблица 1.

Характеристики пробоотборников диаметром 25 мм

Наименование	Материал	Общая длина, см	Глубина погружения, мм	Число камер	Емкость камеры, мл
All-Layer-Sampler	V4A	55	430	3	70
All-Layer-Sampler	V4A	85	710	3	130
All-Layer-Sampler	V4A	150	1355	5	260
Multi-Sampler	V4A	55	430	3	14
Multi-Sampler	V4A	85	710	3	17
Multi-Sampler	V4A	150	1355	5	17
Uno-Sampler	V4A/ПТФЭ	55	430	1	17
Uno-Sampler	V4A/ПТФЭ	85	710	1	17
Uno-Sampler	V4A/ПТФЭ	150	1355	1	17

Зональные **пробоотборники Novartos** для фармацевтических препаратов соответствуют требованиям FDA по отбору унифицированных проб. Поверхность пробоотборника из нержавеющей стали V4A (1.4404 / 1.4571) отполирована вручную, неровности отсутствуют.

Данный пробоотборник позволяет отбирать двойную пробу при неподвижной трубке, погруженной в объём материала. Это в значительной степени позволяет избежать перемешивания материала. На штоке пробоотборника с помощью лазерной гравировки нанесена шкала, позволяющая точно определить глубину погружения пробоотборника. Пробоотборные вкладыши объемом от 0,1 до 4,0 мл плотно сидят в гнездах и легко заменяются.

Пробоотборники Novartos изготавливаются в двух вариантах: Novartos Uno, длиной 600, 1000 и 1400 мм, для точечного пробоотбора и Novartos Multi, длиной 1000 мм, для многоуровневого отбора проб (рисунки 2, 3).

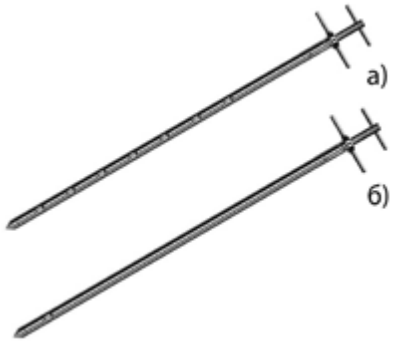


Рисунок 2. Пробоотборники Novartos: а) Novartos Multi, б) Novartos Uno



Рисунок 3. Пробоотборная камера Novartos Multi

Специально для отбора очень малых по объему проб сильнодействующих, дорогостоящих или химически активных порошкообразных препаратов разработан **пробоотборник PharmaPicker**, позволяющий отбирать пробы очень малого объема – от 0,1 до 2,5 мл. С помощью простой смены наконечников в цилиндрах для сбора образца для 0,1–1,2 мл или 1,25–2,5 мл меняется объем. PharmaPicker выполнен из нержавеющей стали V4A с электрополированной поверхностью.

PharmaPicker размером 60 см может удлиняться с помощью удлинительных штоков 50 или 100 см до максимального размера 3,5 м. PharmaPicker поставляется отдельно или в комплекте с кофром PharmaPicker, в практичном чехле для транспортировки (рисунки 4, 5).

Для отбора микропроб порошкообразных материалов прекрасно подойдет **пробоотборник MicroSampler**. С его помощью Вы можете отбирать



Рисунок 4. Применение PharmaPicker

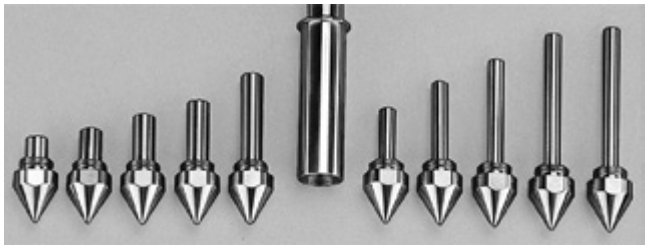


Рисунок 5. Наконечники PharmaPicker

пробы объемом 0,2 мл, 0,5 мл, 1,0 мл, 2,0 мл, 5,0 мл, 10,0 мл различной глубины из мешков и емкостей. Отбор проб осуществляется легко, быстро и аккуратно. Наконечники MicroSampler взаимозаменяемы, что обеспечивает применение сменных наконечников различной емкости (рисунки 6, 7).



Рисунок 6. Отбор проб порошкообразных материалов с MicroSampler



Рисунок 7. Наконечник MicroSampler

Таблица 2.

Характеристики пробоотборников MicroSampler

Диаметр трубки, мм	Длина, см
12,0	55
12,0	85
12,0	120
25,0	55
25,0	85
25,0	120

ОБЕСПЕЧЕНИЕ СОХРАННОСТИ ПРОДУКТА ПОСЛЕ ПРОБООТБОРА

В ответ на многочисленные запросы потребителей компания Bürkle разработала специальные контрольные стикеры **close-it food & pharma**, в которых используется клеящее вещество, соответствующее нормативам FDA и рекомендованное для использования при работе с пищевыми продуктами. Стикер обеспечивает надежное заклеивание отверстий, сделанных в процессе пробоотбора, предотвращая высыпание материала (рисунок 8).



Рисунок 8. Стикер close-it food & pharma

Стикер имеет изолирующий слой из алюминиевой фольги. Это делает его пригодным для работы с продуктами питания, фармацевтическими препаратами, косметическими средствами и пищевыми добавками, то есть для работы со всеми веществами, загрязнение которых клеящим составом недопустимо.

ОДНОРАЗОВЫЕ ПРОБООТБОРНИКИ

Чистка многоразовых пробоотборников представляет собой весьма трудоемкую, а порой и сложную процедуру. Более того, в случае с жирными высокоадгезивными или ядовитыми субстанциями она отчасти вообще невозможна. С учетом трудозатрат на чистку и связанных с ними издержек зачастую выгоднее использовать одноразовые пробоотборники.

Одноразовые пробоотборники Bürkle разработаны специально для взятия проб из жидкостей, вязких субстанций, порошков и гранулятов. С их помощью можно осуществлять точечный, многоуровневый и сквозной отбор проб, а также отбор малых и больших проб. Загрязнение образца при этом абсолютно исключено. В отличие от традиционных многоразовых пробоотборников одноразовые пробоотборники не требуют очистки после использования, следовательно, не требуется валидация методик очистки при аудитах, что позволяет экономить время и средства.

Широкий диапазон одноразовых пробоотборников Bürkle подойдет для решения самых разных задач.

С помощью одноразового пробоотборника **LiquiDispo** возможен отбор проб в диапазоне от жидкостей до слабовязких жидких субстанций. Эргономичная ручка облегчает взятие пробы, поскольку возможно всасывание объема до 200 мл так же, как шприцем.

Одноразовый пробоотборник **ViscoDispo** позволяет осуществить забор проб из высоковязких субстанций со значением вязкости до 100000 мПас. Ручка эргономичной формы и очень стабильная тяга облегчают засасывание даже вязких субстанций.

Специально для отбора проб из разных слоёв порошковых или слегка липких субстанций разработан одноразовый пробоотборник **PowderDispo**. Благодаря наличию трубки обеспечивается возможность взятия полной многоуровневой пробы из мешков или небольших емкостей.

Одноразовый многоуровневый пробоотборник **ZoneDispo** позволяет сформировать репрезентативную многоуровневую пробу из различных слоёв за один отбор. Он подходит для свободно текучих порошков и мелкозернистых гранулятов. Полученная проба может сохраняться и транспортироваться в закрытом пробоотборнике (рисунок 9, таблица 3).

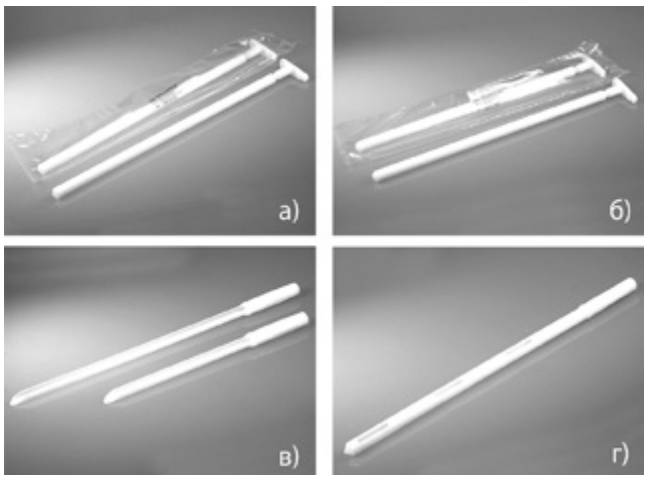


Рисунок 9. **Одноразовые пробоотборники: а) LiquiDispo, б) ViscoDispo, в) PowderDispo, г) ZoneDispo**

Таблица 3.

Характеристики одноразовых пробоотборников DispoSampler

Наименование	Длина, мм	Емкость, мл	Число камер	Материал
LiquiDispo	500	100		ПЭВП
LiquiDispo	500	100		ПЭВП/стерил.
LiquiDispo	1000	200		ПЭВП
LiquiDispo	1000	200		ПЭВП/стерил.
ViscoDispo	500	100		ПЭВП
ViscoDispo	500	100		ПЭВП/стерил.
ViscoDispo	1000	200		ПЭВП
ViscoDispo	1000	200		ПЭВП/стерил.
PowderDispo	300	60		ПЭВП
PowderDispo	300	60		ПЭВП/стерил.
PowderDispo	500	100		ПЭВП
PowderDispo	500	100		ПЭВП/стерил.
ZoneDispo	500	100	3	ПЭВП
ZoneDispo	500	100	3	ПЭВП/стерил.
ZoneDispo	1000	200	3	ПЭВП
ZoneDispo	1000	200	3	ПЭВП/стерил.

Пробоотборники LiquiDispo, ViscoDispo, PowderDispo, ZoneDispo изготовлены в чистой комнате со стерилизацией гамма-излучением в качестве дополнительной опции.

Пробоотборный совок SteriPlast® – это идеальное решение для работы с порошками, гранулятами или пастами. Сразу же после отбора пробы совок снова закрывается прозрачной крышкой, обеспечивая отобранному материалу стерильность и защиту от загрязнений.

При разработке пробоотборного совка компания Bürkle уделила особое внимание эргономике. Благодаря специальной форме ручки и слегка изогнутой передней кромке совок устойчив в горизонтальном положении, то есть его можно поставить на какое-либо основание, не опасаясь просыпать набранную пробу (рисунок 10, таблица 4).



Рисунок 10. Пробоотборный совок SteriPlast®

Пробоотборная ложка SteriPlast® из полистирола, представленная в двух размерах: 2,5 мл (как чайная ложка) и 10 мл (как столовая ложка), прекрасно подойдет для забора проб в виде порошка, гранулята, пасты или жидкости (рисунок 11).

Пробоотборный **шпатель SteriPlast®** из полистирола – это оптимальное решение для отбора проб в виде порошка, гранулята или пасты. Даже такое одноразовое изделие обеспечивает возможность прокола тары, например бумажного и полимерного мешка, благодаря длинной и стабильной ручке эргономичной формы, а также острому лезвию. Шпатель с прозрачным футляром можно закрыть сразу же после отбора материала, защитив тем самым взятую стерильную пробу от внешних загрязнений (рисунок 12, таблица 5).

Пробоотборный совок SteriPlast®, пробоотборная ложка SteriPlast®, пробоотборный шпатель SteriPlast®



Рисунок 11. Пробоотборная ложка SteriPlast®

из полистирола изготавливаются в чистой комнате Bürkle класса 7 (10.000). Они раздельно упаковываются, а затем стерилизуются гамма-излучением. Данные устройства пробоотбора имеют допуски по пищевым стандартам EC и FDA.

Таблица 4.

Пробоотборный совок SteriPlast®

Объём, мл	Исполнение	Длина, мм
25	без крышки	141
25	с крышкой	142
50	без крышки	160
50	с крышкой	161
100	без крышки	205
100	с крышкой	206
150	без крышки	216
150	с крышкой	518
250	без крышки	232
250	с крышкой	235
500	без крышки	280
500	с крышкой	283



Рисунок 12. Пробоотборный шпатель SteriPlast®



Рисунок 13. Черпак из нержавеющей стали

Таблица 5.

Характеристики пробоотборного шпателя SteriPlast®

Глубина врезания, мм	Исполнение	Общая длина, мм
150	Без футляра	263
150	С футляром	268

ПРОБООТБОР ВЯЗКИХ МАТЕРИАЛОВ

Для взятия образцов и выборочных проб для анализа вязких, липких, слежавшихся и замерзших веществ компания Bürkle разработала серию пробоотборников для вязких материалов.

Черпак Bürkle из нержавеющей стали V2A (1.4301) в комплекте со штоком не имеет отверстий и технологических неровностей, в которых могут оставаться следы ранее отобранных проб. Отсутствие пор на поверхности металла обеспечивается за счет использования лазерной сварки (рисунок 13).

Черпак из нержавеющей стали можно стерилизовать на открытом пламени, что позволяет производить отбор проб питьевой воды без загрязнения ее посторонними микроорганизмами.

Пробоотборник **Mini ViscoSampler** предназначен для отбора проб вязких веществ, в том числе паст, донных отложений, кремов. Проба всасывается с помощью поршневого штока и поступает в контейнер для образцов. Простота очистки обеспечивает высокое качество отбираемых проб. При необходимости, в зависимости от вязкости пробы, съемная всасывающая головка пробоотборника может быть дополнительно снабжена всасывающими отверстиями от 2 до 6 мм. Выполненный из нержавеющей стали V4A (1.4404) пробоотборник можно стерилизовать, а значит, он идеально подходит для фармацевтических производств (рисунок 14).



Рисунок 14. Компактный пробоотборник Mini ViscoSampler

Пробоотборник LiquiSampler для жидкостей соответствует требованиям стандарта DIN 53 242. Он изготовлен из высокочистого и химически инертного ПТФЭ/ФЭП или ПП, что позволяет избежать загрязнения пробы посторонними веществами. LiquiSampler предназначен для точечного пробоотбора, многоуровневого пробоотбора либо отбора донных проб из открытых и закрытых бочек и баков. Подвижное кольцо-скребок для маркировки глубины и очистки (рисунок 15).

Пробоотборник ViscoSampler с большой силой всасывания подходит для работы с вязкими веществами, такими как суспензии, жидкие глины, отложения, масла, эмульсии, кремы и т.д. Набор и выдавливание жидкости производится с помощью отсосной колбы. Пробоотборник изготовлен из высокочистого и химически инертного ПТФЭ/ФЭП, что позволяет избежать



Рисунок 15. LiquiSampler при отборе проб



Рисунок 16. Пробоотборник ViscoSampler

загрязнения пробы посторонними веществами (рисунок 16).

Все поверхности пробоотборников ViscoSampler не имеют пор или технологических неровностей, что предотвращает образование загрязнений и обеспечивает легкость очистки. В таких пробоотборниках задействованы исключительно резьбовые соединения с круглым профилем, предназначенные для использования в фармацевтической промышленности и отвечающие санитарным нормам.



Рисунок 17. Пробоотборник для жидкостей открывается большим пальцем

Пробоотборник для жидких и вязких жидкостей LiquidSample оборудован выпускной воронкой для безопасного заполнения бутылей. Для опорожнения образца клапан открывается с помощью большого пальца. Пробоотборник выполнен из нержавеющей стали V4A (1.4404) с полированной поверхностью и соответствует стандартам GMP (рисунок 17).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Правильный выборочный отбор проб для анализа и контроля качества является очень важной темой. Современные методы исследования материалов позволяют очень точно определить их характеристики. В то же время ошибка, допущенная при отборе пробы, делает бессмысленным использование этих методов, поскольку она войдет в результаты всех проведенных измерений и полученный в конечном счете результат анализа будет неверным. Таким образом, правильное заключение о свойствах анализируемого материала может быть обеспечено только при условии, что отбор и последующее хранение проб были проведены с должной тщательностью и аккуратностью.

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЗ МЕТОК: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМ BIACORE™ ОТ GE HEALTHCARE ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ПРОЦЕССОВ РАЗРАБОТКИ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Статья предоставлена компанией GE Healthcare

Перевод: М.А. Брыкина,

менеджер по продвижению
ГК «Фармконтракт»

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЗ МЕТОК: ОТ ИССЛЕДОВАНИЯ ДО ПРОИЗВОДСТВА БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

На сегодняшний день биотерапевтические препараты такие, как моноклональные антитела (МАТ) и рекомбинантные белки, приобретают все большую значимость, что обусловлено их высокой эффективностью и довольно быстрыми сроками проведения изысканий.

Всестороннее описание биотерапевтических препаратов является важным аспектом изысканий и разработки. Например, эффективный отбор, оптимизация и описание свойств лекарственных препаратов на основе моноклональных антител имеет принципиальную значимость на всех этапах разработки. Получение и очистка белков посредством крупномасштабного культивирования клеток (например, клеток CHO) требует мониторинга возможной контаминации белками клеток-хозяина. Такие вопросы наряду с повышением требований регуляторных органов к более частому и масштабному проведению исследований, безопасности и эффективности обуславливают на повышение требований к экономически эффективному аналитическому оборудованию, используемому в процессе разработки биотерапевтических препаратов – от этапа исследования до серийного производства.



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Система Biacore™ компании GE Healthcare позволяет получить подробные характеристики ведущих компонентов биотерапевтических препаратов, а также быстро определить содержание белка.

ЧТО МОГУТ ПРИВНЕСТИ СИСТЕМЫ BIACORE™ В UPSTREAM (КУЛЬТИВИРОВАНИИ) И DOWNSTREAM (ОЧИСТКЕ) ПРОЦЕССЫ?

Эффективная разработка технологического процесса позволяет снизить стоимость на этапе промышленного производства. Также необходимо учитывать множество нормативных требований, например, использование валидированных анализов для контроля концентрации рекомбинантных белков или МАТ, полученных из клеточных культур, в течение всего производственного процесса.

Системы Biacore™ предназначены для автоматического анализа биомолекулярных взаимодействий без использования меток, что обеспечивает надежное определение концентрации и кинетических свойств, их воспроизведение. Данная информация способствует оптимизации процесса очистки белков, а также производства высококачественных биотерапевтических продуктов.

КАКОВЫ ПРЕИМУЩЕСТВА ПРИМЕНЕНИЯ СИСТЕМ BIACORE™ ПЕРЕД ДРУГИМИ АЛЬТЕРНАТИВНЫМИ ТЕХНОЛОГИЯМИ?

1. Системы Biacore™ предназначены для работы в условиях GLP, GMP, GCP и соответствуют требованиям 21 CFR часть 11.
2. Определение концентрации и измерение активности специфического связывания без калибровочной кривой.
3. Встроенный контроль качества количественных показателей.
4. Кинетические свойства и профили для поддержки анализа устойчивости и эффективности лекарственного препарата.
5. Автоматическая система анализа без использования меток.
6. Быстрая и простая разработка и передача методик испытания.

ВАЖНА ЛИ КИНЕТИКА СВЯЗЫВАНИЯ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ?

Кинетические характеристики определяют способ взаимодействия лекарственного препарата с клетками-мишенями *in vivo*. Специфические кинетические свойства биотерапевтических препаратов способны оказывать влияние на различные аспекты эффективности лекарственного средства, например при изменении технологического процесса и производственных условий. Контроль лекарственного средства с использованием профиля связывания становится все более распространенной частью испытаний партии продукта:

- скорость ассоциации влияет на дозирование – зависимость от концентрации;

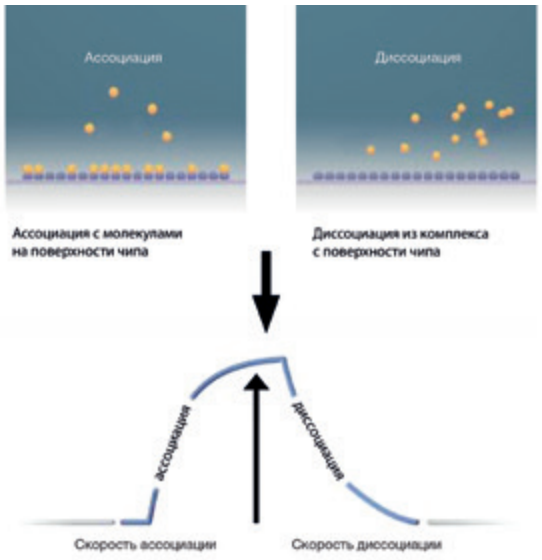


Рисунок 1. Наблюдение в режиме реального времени за ответом связывания (сенсограмма) предоставляет информацию о различных кинетических профилях (т.е. скоростях ассоциации и диссоциации), аффинности и содержании белка на основе характеристик специфического связывания

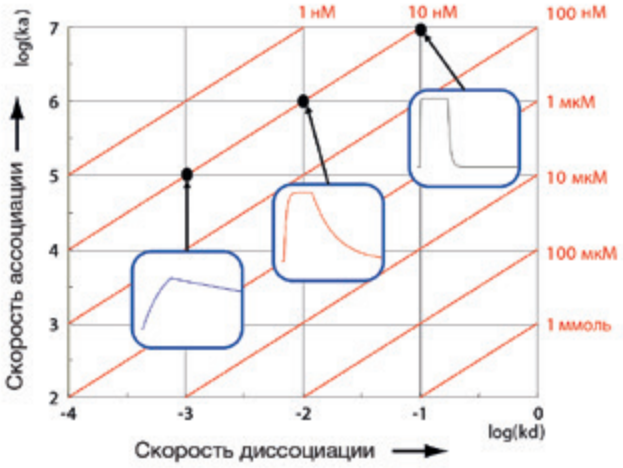


Рисунок 2. Карта-схема скорости ассоциации/диссоциации. Три белка с одинаковой диагональю аффинности 10 нМ имеют различающиеся на несколько порядков скорости ассоциации/диссоциации. Смоделированная сенсограмма показывает соответствующие профили связывания (квадратные вставки). Профили связывания могут использоваться для контроля колебаний показателей качества между партиями

- скорость диссоциации обуславливает время обработки клеток-мишеней лекарственным средством – критически важное свойство с множеством последствий.

ПОЧЕМУ СЛЕДУЕТ ИСПОЛЬЗОВАТЬ СИСТЕМЫ BIACORE™ ДЛЯ АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИИ?

Принципы измерения концентрации с использованием систем Biacore™ во многом аналогичны таким утвержденным методикам как иммуноферментный анализ, за исключением того, что при анализе с Biacore™ контролируется и количественно выражается полное взаимодействие, что позволяет определять параметры на основе скорости и в конечной точке. Использование анализа взаимодействия Biacore™ при определении концентрации имеет ряд преимуществ:

- Определение параметров в режиме реального времени – не требуется использование вспомогательных реагентов или мечения.
- Встроенный контроль качества для каждого этапа анализа.
- Метод детектирования, позволяющий анализировать такие сложные образцы, как матрицы загрузочного материала и супернатанта.

Как же системы Biacore™ могут применяться в upstream и downstream процессах?

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОЧИСТКИ БИОАНАЛОГОВ МАТ

При разработке процедуры очистки необходимо учесть разнообразие антител. Системы Biacore™ – это превосходный инструмент для идентификации, отбора и оптимизации условий получения белков и наиболее эффективных условий элюирования. Ниже представлены различные условия очистки IgG, количество которого измерялось после каждого этапа очистки.

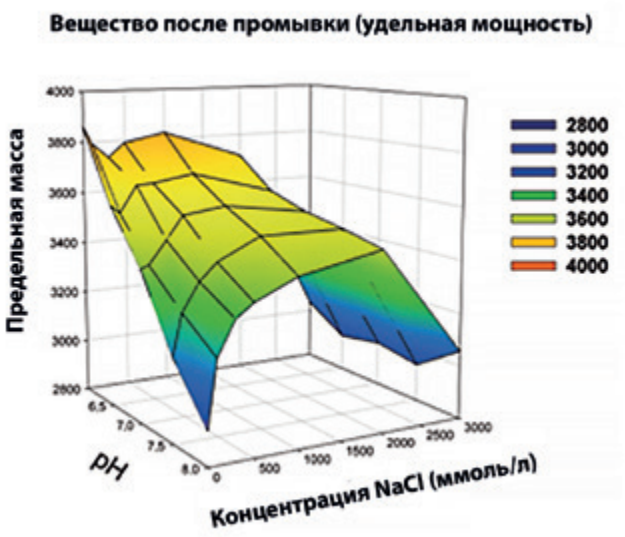


Рисунок 3. Графическое представление данных: выбор наилучших условий сбора различных IgG. Данные предоставлены компанией Novo Nordisk AS

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ IGG В СЛОЖНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ, МАТРИЦЕ СУПЕРНАТАНТА, А ТАКЖЕ БУФЕРНЫХ РАСТВОРАХ

Быстрое и воспроизводимое количественное определение IgG производится в течение 5 мин. Автоматический анализ с использованием систем Biacore™ обеспечивает более широкий диапазон измерения, чем иммуноферментный анализ, с вариативностью результатов разных анализов менее 3 CV % (таблица 1).

КОНЦЕНТРАЦИЯ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

Биологические молекулы клеток хозяина могут оказывать токсичное воздействие. Поэтому для предотвращения возможных негативных последствий необходимо устранить белки клеток хозяина (HCP), а

Таблица 1.

Иммуноферментный анализ человеческого IgG				Система Biacore™		
Образцы*	**Титр**	**CV**	**Восстановление**	**Титр**	**CV**	**Восстановление**
Образец 1 97 мкг/мл	90 мкг/мл	6–8%	70–110%	86 мкг/мл	2,60%	87–103%
Образец 2 965 мкг/мл	770 мкг/мл	15%	70–110%	769 мкг/мл	1,50%	87–103%
Измерительный диапазон	2,5–20 нг/мл			100–12800 нг/мл		

Примечание: * – образцы растворяли до соответствия проверочному диапазону. Данные предоставлены компанией Merck Serono (Франция).

после очистки провести проверку на наличие какого-либо количества оставшихся HCP. Системы Biacore™ отличаются гибкостью проведения различных методов анализа, обеспечивая прямое или непрямое связывание для соответствия требованиям проведения экспериментов.

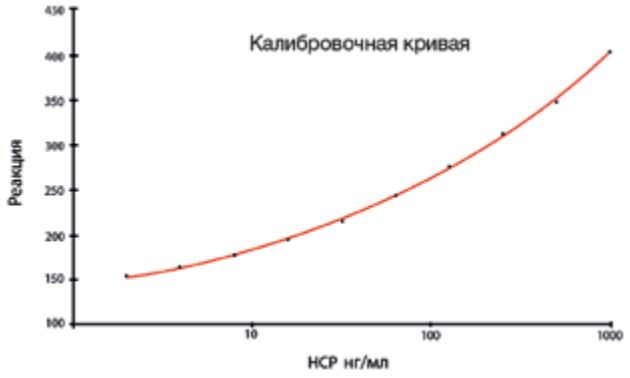


Рисунок 4. Калибровочная кривая белков клеток хозяина из клеток CHO

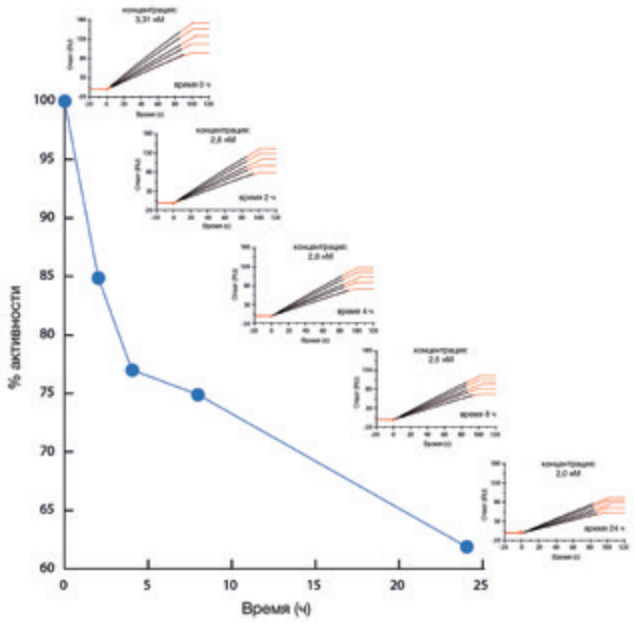


Рисунок 5. Основанный на активности специфического связывания анализ устойчивости целевого белка во время стрессового воздействия при отсутствии надежных стандартных образцов. Концентрация целевого белка была измерена α-цепочкой клеточного рецептора IgE. Наблюдалось быстрое снижение активности (менее чем за 8 ч), обусловленное возрастанием активности специфического связывания. Данные предоставлены компанией Resistentia Pharmaceuticals

АНАЛИЗ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЗ КАЛИБРОВКИ (CFCA)

Знание точной концентрации лекарственного средства в зависимости от активности специфического связывания – это бесценная информация, которая может быть использована для оценки активности, стабильности и однородности характеристик терапевтического препарата от серии к серии. Система Biacore™ T100 позволяет анализировать концентрацию без калибровки, проводить количественный анализ при отсутствии стандартных образцов, или в случае если использование ненадежного стандартного образца является единственной альтернативой.

КАК ИСПОЛЬЗУЮТСЯ СИСТЕМЫ BIACORE™ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ И КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА?

При внутрипроизводственном контроле и контроле качества с помощью валидированного анализа контролируется многостадийная экспрессия и очистка биологического продукта. Высококачественный анализ в режиме реального времени, обеспеченный системами Biacore™, позволяет проводить быстрый и надежный мониторинг контроля качества при минимальном времени разработки методики анализа. Например, анализ систем Biacore™ может использоваться вместо иммуноферментного анализа, снижая время проведения анализа и значительно сокращая общую продолжительность процессов очистки. Включение кинетического анализа в мониторинг контроля качества обеспечивает уникальную возможность получить подробные данные связывания, имеющие большое значение для клинического действия биологического продукта. Различия показателей между партиями легко выявить с помощью мониторинга профиля связывающего взаимодействия по сравнению с эталонными показателями для каждой партии продукта.

Подробные данные, полученных с помощью систем Biacore™, позволяют принять решение о необходимости раннего прекращения производства серийной партии или об изменении настроек условий культивирования.

УЛУЧШЕНИЕ UPSTEAM И DOWNSTREAM ПРОЦЕССОВ

Применение систем Biacore™ при разработке технологического процесса и производстве предоставляет множество преимуществ:

- Снижение продолжительности разработки при оптимизации клеточной линии и условий очистки.
- Получение количественных данных без использования стандартных образцов.
- Повышение производительности и качества данных.
- Улучшение стабильности качества продукта.
- Легкость передачи технологии анализа, разработанного для внутреннего пользования, сторонним организациям, без ущерба установленным стандартам технических характеристик.

Налаженные процессы управления проектами и планирования бюджета позволяют реализовывать комплексные проекты и отдельные работы одинаково качественно с соблюдением сроков вне зависимости от масштаба проекта.

ПРОЕКТИРОВАНИЕ

- Концептуальный проект
- Проектирование на стадиях Проект и Рабочая документация
- Адаптация иностранных проектов и технологий
- Экспертиза проектной документации
- Сопровождение при получении ИРД, ТУ и прочих документов
- Инженерные изыскания, проведение обследований
- Консультирование в процессе проектирования, сопровождение проектных работ

ИНЖЕНЕРНЫЕ СИСТЕМЫ

- Вентиляция и холодоснабжение, отопление
- Автоматизация технологических процессов и инженерных систем
- Силовое электрооборудование и электроосвещение
- Водопровод и канализация
- Слаботочные системы
- Технологические газы

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ПОДРЯД

УПРАВЛЕНИЕ ПРОЕКТАМИ

СЕРВИСНОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ



ООО **“МФарм”** в составе
ГК **“Фармконтракт”**

Москва: +7 (495) 646-02-10
Санкт-Петербург: +7 (812) 578-50-46

msk@mfarm.ru
www.mfarm.ru

Компания **МФарм** на сегодня входит в пятёрку лучших инжиниринговых компаний на рынке чистых помещений (по признанию участников рынка).

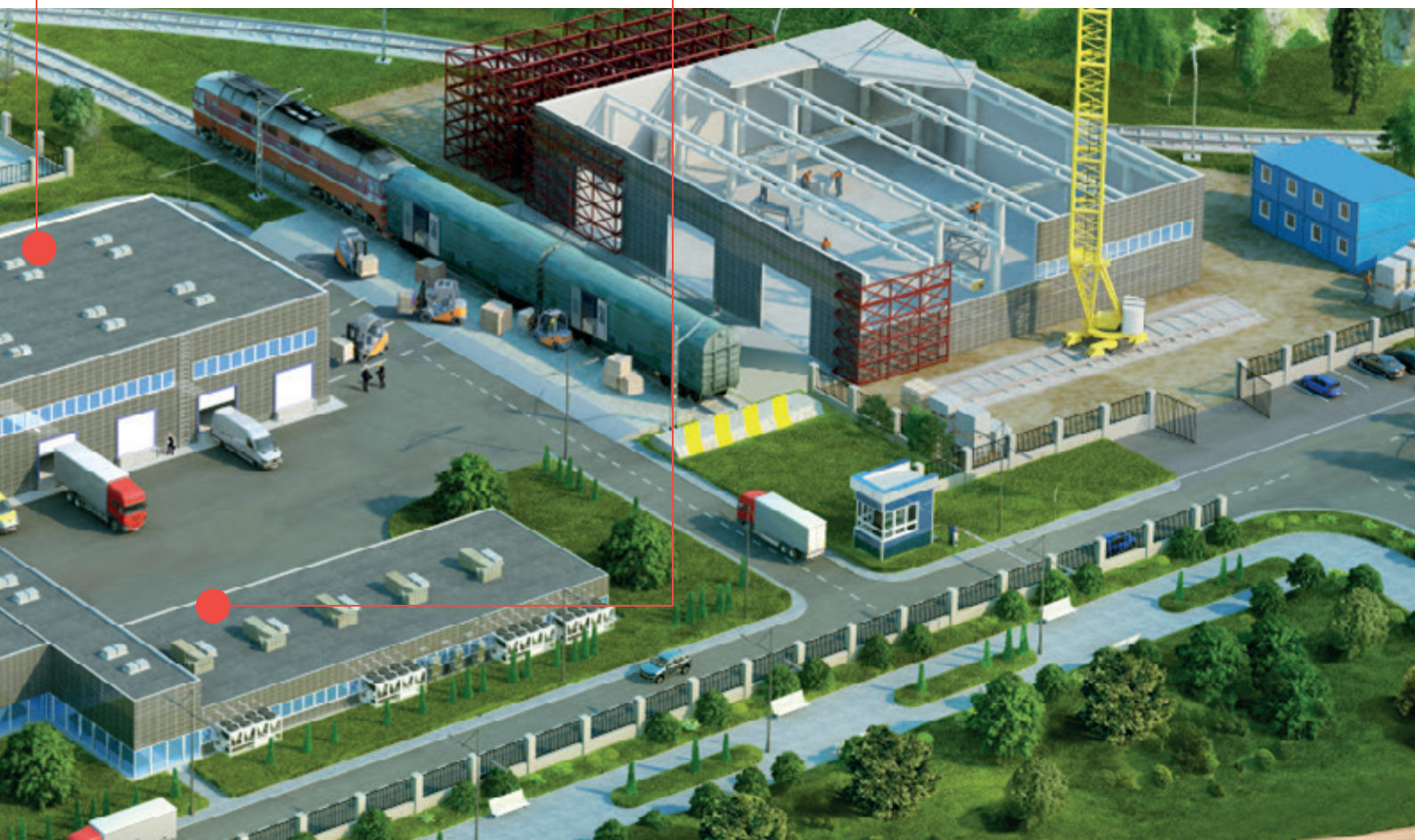
ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ

- Монтаж чистых помещений «Под ключ»
- Локальные чистые зоны (Ламинарные укрытия)
- Ограждающие конструкции чистых помещений
- Соответствие требованиям GMP и Российским нормативным документам

КВАЛИФИКАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ

- Проектной документации
- Чистых помещений и зон, визуализация воздушных потоков
- Инженерных систем и оборудования
- Технологического и лабораторного оборудования
- Компьютерных систем управления
- Методик и процессов

MTEX **Производим конструкции для чистых помещений под брендом MTEX**



PRESTO W50 и W50t

Совершенно новое поколение высокодинамичных систем температурного контроля



Новые PRESTO® от Julabo разработаны специально для высокоточного температурного контроля и оптимально подходят для термостатирования реакторов, тестирования материалов или моделирования температурных режимов. Они характеризуются высокой мощностью нагрева и охлаждения и широким диапазоном рабочих температур от -92 °C до +250 °C.

Новые системы термостатирования PRESTO® обеспечивают постоянный контроль давления, что позволяет защитить Ваше оборудование от повреждений и избежать дорогостоящего ремонта. Интеллектуальная система управления насосом позволяет компенсировать погрешности температурного контроля, вызванные изменением вязкости теплоносителя.

Ваши преимущества:

- Высокоточное термостатирование внешних систем
- Экстремально короткое время нагрева и охлаждения
- Быстрая компенсация экзо- и эндотермических эффектов
- Широкий диапазон рабочих температур без смены теплоносителя
- Максимальная производительность при минимальных габаритных размерах
- НОВИНКА: 5,7” цветной сенсорный дисплей
- До 3-х уровней пользовательского доступа с защитой паролями
- НОВИНКА: Управление с ПК при помощи USB
- НОВИНКА: Ethernet-соединение
- НОВИНКА: Сохранение данных на SD-карте
- RS232 / RS485 / Profibus DP
- Аналоговые интерфейсы
- Заполнение прибора сверху

Julabo
Temperature Control Company

+7 (495) 252-00-98
(центральный офис в москве)
8 (800) 333-69-11
(бесплатный звонок по россии 24 часа)
info@phct-group.com
www.phct-group.com

Pharmcontract
group of companies

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

* Отсканированную копию заполненной анкеты необходимо выслать на электронный почтовый адрес редакции: info@pharmjournal.ru или Почтой России по адресу: 115516, Москва, Россия, ул. Промышленная, д.11, стр.3, оф. 419.
Также Вы можете оформить подписку на нашем сайте в разделе «Подписка»: **www.pharmjournal.ru**

Благодарим Вас за неоценимый вклад в развитие Журнала!