https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03

ISSN 0367-3014 (print)
ISSN 2541-9218 (online)

ФАРМАЦИЯ

издается с 1952 года

научно-практический журнал
a scientific and practical journal

www.pharmaciyajournal.ru
www.rusvrach.ru

FARMATSIYA
Pharmacy (in Russia)

в номере:

- ПРОВИЗОР-АНАЛИТИК: ОПТИМИЗАЦИЯ РАБОТЫ
- СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ ИММУНОГЛОБУЛИНА
- НОВОЕ ОБ АМИНОКИСЛОТАХ В СЫРЬЕ И СБОРАХ
- ОПРЕДЕЛЕНИЕ РТУТИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

том 69
volume 69
№ 3
2020

ФАРМАЦИЯ (Farmatsiya) https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03 ISSN 0367-3014 (print)
Основан в 1952 г. Выходит 8 номеров в год ISSN 2541-9218 (online)

Журнал представлен в международных реферативных базах
Chemical Abstracts, Web of Science (BIOSIS) и на платформе EBSCO

УЧРЕДИТЕЛИ

Министерство Здравоохранения Российской Федерации
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)
Российский центр фармацевтической и медико-технической информации

ИЗДАТЕЛЬ — ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ДОМ «РУССКИЙ ВРАЧ»

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

И.А. Самылина – доктор фармацевтических наук, член-корреспондент РАН, Почетный профессор кафедры фармацевтического естествознания Департамента образования Института фармации Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет) *(Москва, Россия)*

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА*

А.А. Сорокина – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтического естествознания Департамента образования Института фармации Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет) *(Москва, Россия)*

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ

Р.Н. Аляутдин – доктор медицинских наук, профессор, Научный центр экспертизы средств медицинского применения. заместитель директора Центра экспертизы безопасности лекарств *(Москва, Россия)*

В.Д. Белоногова – доктор фармацевтических наук, заведующая кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники Пермской государственной фармацевтической академии Минздрава РФ *(Пермь, Россия)*

В.В. Береговых – доктор технических наук, профессор , академик Российской академии наук, заместитель академика-секретаря Отделения медицинских наук Президиума Российской академии наук, начальник отдела медицинских наук, член экспертного совета Национальной технологической инициативы (НТИ), член рабочей группы HealthNet *(Москва, Россия)*

В.А. Быков – доктор технических наук профессор, академик РАН, главный научный сотрудник ВИЛАР *(Москва, Россия)*

Г.Т. Глембоцкая – доктор фармацевтических наук , профессор кафедры организации и экономики фармации Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) *(Москва, Россия)*

К.Г. Гуревич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни – залог успешного развития» Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова *(Москва, Россия)*

И.И. Краснюк – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической технологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) *(Москва, Россия)*

В.Г. Макаров – доктор медицинских наук, профессор, генеральный директор ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации» *(Санкт-Петербург, Россия)*

Ю.В. Мирошниченко – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой военно-медицинского снабжения и фармации Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова *(Санкт-Петербург, Россия)*

И.А. Наркевич – доктор фармацевтических наук, профессор, ректор Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения РФ *(Санкт-Петербург, Россия)*

Н.А. Оборотова – доктор фармацевтических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина Минздрава России *(Москва, Россия)*

Р.С. Сафиуллин – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой управления и экономики фармации Казанского государственного медицинского университета Минздрава России *(Казань, Россия)*

А.И. Сливкин – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного университета Минздрава России *(Воронеж, Россия)*

А.В. Солонинина – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой управления и экономики фармации Пермской государственной фармацевтической академии Минздрава России *(Пермь, Россия)*

Е.А. Тельнова – доктор фармацевтических наук, Национальный НИИ общественного здоровья *(Москва, Россия)*

Н.А. Тюкавкина – доктор химических наук, Заслуженный профессор, Заслуженный деятель науки РФ, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) *(Москва, Россия)*

Г.В. Шашкова – кандидат фармацевтических наук, профессор, эксперт Всемирной организации здравоохранения, член Экспертной группы ВОЗ по международным непатентованным наименованиям фармацевтических субстанций, директор РЦ «Фармединфо» *(Москва, Россия)*

Ж. Ульрихова – доктор наук, профессор на медицинском факультете Университета им. Палацкого в г. Оломоуц *(Всетин, Чехия)*

Р. ван Хазелен – магистр наук, директор Международного Института Интегрированной Медицины (ИНТМЕДИ) Соединённого Королевства, председатель Комиссии по документам клинических исследований при Гомеопатическом фармакопейном комитете Соединенных Штатов Америки, директор по проведению форума интеграционной медицины *(Нидерланды)*

FARMATSIYA (Pharmacy)
Founded in 1952

https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03
Published 8 times a year

ISSN 0367-3014 (print)
ISSN 2541-9218 (online)

The Journal presented in the International Database
Chemical Abstracts, Web of Science (BIOSIS) and EBSCO

FOUNDERS

Ministry of Health of the Russian Federation
Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)
Russian Center for Pharmaceutical and Medical Technical Information

THE JOURNAL IS PUBLISHED BY THE RUSSIAN PHYSICIAN PUBLISHING HOUSE

EDITOR-IN-CHIEF

Samylina Irina A. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Honorary professor Subdepartment of Pharmaceutical Natural Science, Education Department, Institute of Pharmacy, First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

DEPUTY CHIEF EDITOR

Sorokina Alla A. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Subdepartment of Pharmaceutical Natural Science, Education Department, Institute of Pharmacy, First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

EDITORIAL MEMBERS

Alyautdin Renad N. – Doctor of Medicine, Professor, Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expertise ob Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow *(Moscow, Russia)*

Belonogova Valentina D. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Assistant professor, Head of the Department of Pharmacognosy with the course of Botany FGBOU VO «Perm State Pharmaceutical Academy» MH RF *(Perm, Russia)*

Beregovykh Valery V. – Doctor of Engineering, Full Professor, Academician of the Russian academy of sciences, Presidium of the Russian academy of sciences, Deputy Head of Academician-secretary, Department of medical sciences, Head, Department of Medical Sciences Member, Council of Experts, National Technology Initiative; Member, HealthNet Working Group *(Moscow, Russia)*

Bykov Valery A. – Doctor of Engineering, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Principal Researcher, All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants *(Moscow, Russia)*

Glembotskaya Galina T. –Doctor of Pharmaceutical Sciences in the specialty of Drug technology and organization of pharmacy, Professor, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University Sechenov University) *(Moscow, Russia)*

Gurevich Konstantin G. – Doctor of Medicine, Professor, chair holder UNESCO «Healthy life style for sustainable development», Moscow State University of Medicine and Dentistry *(Moscow, Russia)*

Krasnyuk Ivan I. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Sechenov First Moscow State Medical University, head of the Department of pharmaceutical technology *(Moscow, Russia)*

Makarov Valery G. – Doctor of Medicine, Professor, General director of the St-Petersburg Institute of Pharmacy *(St-Petersburg, Russia)*

Miroshnichenko Yuri V. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Military Medical Supply and Pharmacy, FGBIOU in the Military Medical Academy. CM. Kirov *(St-Petersburg, Russia)*

Narkevich Igor A. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, St-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University *(St-Petersburg, Russia)*

Oborotova Natalia A. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Leading researcher of the laboratory for the development of dosage forms of the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the FSBI «N.N. Blokhin Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation *(Moscow, Russia)*

Safiullin Rustam S. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor,Head of the Department of Management and Economics of PharmacyKazan state medical university *(Kazan, Russia)*

Slivkin Alexey I. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the department of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology Voronezh state university *(Voronezh, Russia)*

Soloninina Anna V. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Management and Economics of Pharmacy FGBOU V SPPA (Perm State Pharmaceutical Academy) of the Ministry of Health of Russia *(Perm, Russia)*

Telnova Elena A. – Doctor of Pharmaceutical Sciences, National Research Institute for Public Health *(Moscow, Russia)*

Tyukavkina Nonna A. – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Honoured worker of science of Russian Federation, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University *(Moscow, Russia)*

Shashkova Galina V. – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Expert, World Health Organization; Member, WHO Expert Group for International Nonproprietary Names of Pharmaceutical Substances; Director, Russian Center «Pharmedinfo»

Ulrichova Jitka – Dr., PhD, Professor, Medical Faculty, Palacky University, Olomouc *(Vsetin, Czechia)*

Van Haselen Robbert – MSc, Director, International Institute for Integrated Medicine (INTMEDI), United Kingdom, Chair, Clinical Documentation Committee, Homeopathic Pharmacopoeia of the United States (HPUS), Director, World Integrated Medicine Forum

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОР

Ким Н.О., Ивановская Е.А.
Методы определения ртути в биологических объектах 5

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ И ФАРМАКОГНОЗИЯ

Бунятян Н.Д., Бобизода Г.М., Попова О.А., Саповский М.М., Самиев М., Прокофьев А.Б., Ремезова И.П., Евтеев В.А.
Синтез трипептида H–ProAla–Glu–OH
и изучение его токсикологических свойств 11

Доровских Е.А., Ермакова В.А., Ковалева Т.Ю.
Изучение аминокислотного состава ноотропного сбора 18

Косман В.М., Карлина М.В., Макарова М.Н.
Опыт разработки биоаналитических методик
методом ВЭЖХ с УФ-детектированием 23

Кривых М.А., Корнилова О.Г., Хуснатдинова Е.А., Бунятян Н.Д., Олефир Ю.В.
Методические подходы к разработке и аттестации
стандартного образца иммуноглобулина человека
для определения антикомплементарной активности 36

Никулин А.В., Ямщикова С.И., Потанина О.Г., Абрамович Р.А.
Определение усниновой кислоты в слоевищах
лишайника рода *Cladonia* методом ВЭЖХ-УФ 44

ОРГАНИЗАЦИЯ И ЭКОНОМИКА

Стрелков С.В., Стрелкова В.А., Золотарева Н.Г.
Стандартизация работы провизора-аналитика:
методические подходы 50

Журнал зарегистрирован Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций

Регистрационный номер 77-11255 от 26 ноября 2001 г.

Полное или частичное воспроизведение или размножение материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения Издательского дома «Русский врач»

Редакция рукописи не возвращает. За содержание рекламных материалов редакция ответственности не несет.

Генеральный директор Издательского дома «Русский врач»
Г.С. Зольникова

Директор по рекламе и маркетингу
Н.Г. Данилова
E-mail: pr-median@ya.ru

Адрес редакции и издателя:
119270, Москва,
3-я Фрунзенская ул., д. 6
(2-й этаж)

Дата выхода в свет 14.02.2020

Формат 60×90/8

Бумага мелованная 90 г/м²

Печ. л. 7.00

Цена свободная

Заказ 65

Тираж 3000 экз.

Отпечатано в типографии
ИП «Пушкарев С.В.»
125413, Москва,
ул. Онежская, д. 24, стр. 2

Телефоны:
редакция: +7 (499) 959-63-18 (доб. 200)
отдел подписки: +7 (499) 959-63-18 (доб. 500)
E-mail:
pharmacia@rusvrach.ru
Web-site:
www.pharmaciyajournal.ru
www.rusvrach.ru

Подписной индексно каталогу «Подписные издания»:
П6658

Подписка на электронную версию на сайте **www. rusvrach.ru**

© «Фармация», 2020

Журнал «Фармация» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных изданий ВАК, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук по специальностям: 14.03.00 – медико-биологические науки, 14.04.00 – фармацевтические науки, 02.00.00 – химические науки.
Журнал входит в Российский индекс научного цитирования

CONTENTS

REVIEW

Kim N.O., Ivanovskaya E.A.
Methods for determining mercury in biological objects 5

PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND PHARMACOGNOSY

Bunyatyan N.D., Bobizoda G.M., Popova O.A., Sapovsky M.M., Samiev M., Prokofyev A.B., Remezova I.P., Evteev V.A.
Synthesis of the tripeptide H–ProAla–Glu–OH and the investigation of its toxicological properties 11

Dorovskikh E.A., Ermakova V.A., Kovaleva T.Yu.
Investigation of the amino acid composition of a nootropic herbal tea. 18

Kosman V.M., Karlina M.V., Makarova M.N.
Experience in developing bioanalytical methods by HPLC with UV detection 23

Krivykh M.A., Kornilova O.G., Khusnatdinova E.A., Bunyatyan N.D., Olefir Yu.V.
Methodological approaches to developing and certifying a standard human immunoglobulin sample to determine anticomplementary activity 36

Nikulin A.V., Yamshchikova S.I., Potanina O.G., Abramovich R.A.
Determination of usnic acid in the blastemas of a lichen of the genus *Cladonia* by HPLC-UV 44

ORGANIZATION AND ECONOMY

Strelkov S.V., Strelkova V.A., Zolotareva N.G.
Standardization of an analytical pharmacist's work: methodological approaches 50

The journal was registered by the Press Committee of the Russian Federation under No. 77-11255 on november 26, 2001

Reproduction of materials elsewhere or duplication of the materials published in the journal, in whole or in part, is not permitted without the written consent of the Russkiy Vrach (Russian Physician) Publishing House

The editors have no opportunity of returning manuscripts. The editors provide no warranty as to the contents of advertisements

General Director of «Russkiy Vrach» Publishing House
Galina Zolnikova

Adress of the Editorial office and publisher:
6, 3 Frunzenskaya St.
Build. 6
(2nd floor)
119270, Moscow

Circulation:
3000 экз.

Printed
at the **«Pushkaryov S.V.»**
printing-house:
24, Onejskaya st.,
Moscow, 125413

E-mail:
pharmacia@rusvrach.ru

Web-site:
www.pharmaciyajournal.ru
www.rusvrach.ru

Podpisniye izdaniya index:
П6658

© Farmatsiya (Pharmacy), 2020

The Journal «Pharmacy» is included by the Decision of the Presidium of the Higher Attestation Committee in the List of Leading Peer-Reviewed Scientific Journals that should publish the basic scientific results of dissertationsfor academic degrees of Doctor of Sciences and Candidate of Sciences in specialty: 14.03.00 – biomedical sciences, 14.04.00 – pharmaceutical sciences, 02.00.00 – chemical sciences.
Indexed in Russian Research Citing Index

https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-01

© Н.О. Ким, Е.А. Ивановская, 2020
УДК 615.2/.3.011.17:546.49].074

Методы определения ртути в биологических объектах

Н.О. Ким, Е.А. Ивановская

Новосибирский медицинский государственный университет,

Российская Федерация, 630091, Новосибирск, ул. Красный проспект, д. 52

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ким Надежда Олеговна – аспирант кафедры фармацевтической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский медицинский государственный университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России). Тел.: +7 (903) 939-73-63. E-mail: Kim_Nadia@mail.ru. *ORCID: 0000-0003-0683-0833*

Ивановская Елена Алексеевна – зав. кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России, профессор, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (383) 226-98-11. E-mail: el-ivanovskaja@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Для обеспечения качества фармацевтической субстанции, а также готовых лекарственных средств в процессе разработки, оптимизации и при смене процесса необходимо тщательно контролировать один из его важнейших показателей – примеси. Ртуть является тяжелым металлом, который может попадать в организм с морепродуктами и гидробионтами, поэтому субстанции, получаемые из продуктов морских биоценозов, могут содержать в качестве примеси ртуть. Важно проводить не только качественный анализ, но и найти эффективный количественный анализ лекарственных препаратов, содержащих ртуть, на всех стадиях производственного процесса. Целью данной работы явился литературный обзор методов определения ртути в биологических объектах. В статье представлены данные по существующим современным методам определения ртути как одного из токсических элементов, содержащихся в субстанциях органического происхождения и источниках фармацевтического производства, в том числе на основе протамина и способных к аккумулированию. Проведенный обзор литературы показал, что для определения содержания примесей ртути в источниках фармацевтического производства используются фармакопейный (экстракционно-фотоколориметрический метод с использованием дитизона), спектрофотометрические (в т.ч. атомно-абсорбционная спектрометрия с беспламенной атомизацией – метод «холодного пара»), хроматографические (преимущественно высокоэффективная жидкостная хроматография) и электрохимические (в т.ч. вольтамперометрический анализ) методы.

Ключевые слова: ртуть, методы определения, спектрометрия, хроматография, вольтамперометрия, протамин.

Для цитирования: Ким Н.О., Ивановская Е.А. Методы определения ртути в биологических объектах. Фармация, 2020; 69 (3): 5–10. *https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-01*

METHODS FOR DETERMINING MERCURY IN BIOLOGICAL OBJECTS

N.O. Kim, E.A. Ivanovskaya

Novosibirsk Medical State University; 52, Krasnyi Prospect, Novosibirsk 63001, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Kim Nadezhda Olegovna – postgraduate student of the department of pharmaceutical chemistry, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Novosibirsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (FSBEI HE NSMU). Tel.: +7 (903) 939-73-63. E-mail: Kim_Nadia@mail.ru. *ORCID: 0000-0003-0683-0833*

Ivanovskaja Elena Alekseevna – head of the department of pharmaceutical chemistry, FSBEI HE NSMU, professor, doctor of pharmaceutical sciences, Tel.: +7 (383) 226-98-11. E-mail: el-ivanovskaja@yandex.ru

SUMMARY

To ensure the quality of a pharmaceutical substance and ready-made drugs during development and optimization processes and a process change, it is necessary to carefully control one of its most important indices – impurities. Mercury is a heavy metal that can enter the body with seafood and hydrobionts, so the substances derived from marine biocenosis products may contain mercury as an impurity. It is important not only to carry out a qualitative analysis, but also to find an effective quantitative analysis of mercury-containing drugs at all stages of a production process. The aim of this investigation was to review the literature on methods for determining mercury in biological objects. The paper presents data on existing up-to-date methods to determine mercury, as one of the toxic elements that can accumulate and is contained in organic substances, as well as in pharmaceutical production sources, including those based on protamine. The review of the literature has shown that pharmacopoeial (dithizone extraction/photocolorimetry), spectrophotometric (including flameless or cold vapor atomic absorption spectrometry), chromatographic (mainly high performance liquid chromatography) and electrochemical (including voltammetric analysis) techniques are used to measure mercury as an impurity in the sources of pharmaceutical production.

Key words: mercury, determination methods, spectrometry, chromatography, voltamperometry, protamine.

For reference: Kim N.O., Ivanovskaya E.A. Methods for determining mercury in biological objects. Farmatsiya, 2020; 69 (3): 5–10. *https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-01*

Выпуск готовой продукции, ее физические характеристики и химическая чистота имеют большое значение в производстве фармацевтических субстанций, в том числе в разработке лекарственной формы и производстве готового лекарственного препарата (ЛП). Ртуть относится к наиболее токсичным химическим элементам, контролируемым объединенной комиссией Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (Food and Agriculture Organization) ВОЗ согласно пищевому стандарту Кодекса безопасности пищевых продуктов международной торговли продуктами питания. Оценка качества лекарственного сырья на современном уровне требует определения не только традиционных фармакопейных количественных показателей, но и содержания в нем токсикантов, в том числе ртути, с использованием унифицированных, чувствительных и достаточно простых методик.

Определение элемента при проведении качественного анализа субстанции в чистом растворе или другом объекте, не содержащем других веществ, осуществляется относительно просто. Но когда целевой компонент находится в смеси или в соединении с другими элементами анализируемой системы, как это бывает практически всегда, его определение значительно усложняется [1]. Многочисленные количественные методы определения массовой доли различных химических элементов ведут к ошибочным результатам из-за искажения результатов определений других компонентов. В таких случаях качественный анализ, устанавливающий содержание определенных составных частей в пробе, является необходимым условием [2]. Поэтому развитие комплексного подхода к решению задачи, связанной с выявлением и идентификацией форм элементов, в том числе ртути, в биологических объектах и созданных на их основе ЛП, является актуальной задачей современной аналитической химии. Повышенный интерес к проблеме определения ртути в объектах окружающей среды вызван ее высокой способностью к миграции и биоконцентрированию.

Вещественный анализ химических форм ртути, как и других металлов, может быть экзогенным и эндогенным. К экзогенным формам анализа ртути относят ее неорганические формы и металлоорганические соединения, образовавшиеся еще до поступления в живые организмы и не претерпевшие при этом последних существенных изменений. Токсичные эндогенные формы ртути поступают к человеку с морепродуктами и гидробионтами, образуясь в результате деятельности живых клеток и трансформации экзогенных форм при взаимодействии с макромолекулами (протеинами, аминокислотами и другими биологическими структурами), а также низкомолекулярными органическими лигандами [3].

К классу низкомолекулярных аргинин-богатых ядерных белков, ассоциирующихся с ДНК, относятся протамины. Истинные протамины – это, как правило, короткие белки (50–110 аминокислот), которые могут содержать до 70% аргинина. В фармации применяют субстанции из рыбных протаминов сальмина и клупина. Именно протамины являются единственными на сегодняшний день препаратами, используемыми в медицинской практике для нейтрализации гепарина. Эти белки также нашли широкое применение в качестве высокоэффективных добавок при лечебном питании и пролонгаторов действия ряда ЛП, в частности, инсулина [4]. Информация, полученная о протаминовом семействе ДНК-связывающих белков за последние два десятилетия, начинает оказывать влияние на несколько очень разных областей будущих исследований в области репродуктивной биологии, эволюционной биологии, генной терапии и нанотехнологий [4]. Таким образом, можно акцентировать внимание на важности использования протамина в медицине и колоссальных перспективах данного ЛП как в профилактике, так в диагностике и терапии многих заболеваний, которые на сегодняшний день считаются трудно поддающимися лечению либо вовсе неизлечимы. Но в соответствии с современными представлениями, оценка безопасности ЛП органического происхождения должна учитывать все потенциальные факторы риска, специфичные для данной группы ЛП.

Среди экстракционных реакций для исследования биологического материала на ртуть достаточно широко используется дитизон [5]. Экстракционно-фотоколориметрический метод, основанный на использовании при определении ртути дитизона для количественного определения данного элемента в биологических объектах и лекарственном растительном сырье, указан как один из основных в Европейской Фармакопее, Государственной фармакопее РФ XIII издания (ОФС.1.2.2.2.0005.15 «Ртуть»), Международной Фармакопее (4. Methods for material of plant origin» «2.2.3 Limit test for heavy metals»), Фармакопее США (30, НФ 25 «Dietary supplements», <231> Heavy metals) [6]. Метод основан на образовании нерастворимого в воде, но растворимого в орга-

нических растворителях желто-оранжевого комплекса ртуть(II)-иона с дитизоном.

Достоинством дитизона как реагента на ртуть является его высокая чувствительность и достаточно высокая избирательность. Но при определении ртути с помощью дитизона достаточно большое влияние на правильность определения оказывает присутствие различных ионов в растворе. Показано влияние ионов Cl при концентрации >0,2 N на определение ртути в виде Hg(HDz). Чтобы уменьшить это влияние, рекомендуется понизить концентрацию свободной серной кислоты (до <1 N). При pH 1–2 ртуть можно количественно экстрагировать при предельном соотношении Hg (II): Cl=1:105 [7].

Недостатком дитизона как реагента на ртуть является легкая окисляемость его не только в щелочной, но и в кислой среде под влиянием окислителей и прямого солнечною света. При этом образуются продукты окисления дитизона (дифенилкарбодиазон и др.), окрашенные в желтый цвет и растворимые в четыреххлористом углероде и хлороформе. Не только окраска, но и максимум их поглощения (390–170 нм) лежит близко к однозамещенному дитизонату ртути (485 нм). В связи с этим недостатком для замены дитизона было синтезировано более 70 его аналогов, но ни один из них не нашел такого широкого применения, как дитизон.

Реакция образования однозамещенного дитизоната ртути в условиях исследования биологического материала является специфичной. Но при количествах ртути менее 0,005 мг окраска однозамещенного дитизоната ртути в хлороформе и четыреххлористом углероде имеет желтовато-оранжевый цвет и может вызвать сомнение, так как подобную окраску экстракта могут дать продукты окисления дитизона при несоблюдении условий работы. При сомнительной окраске экстракта дитизоната ртути в 1962 г. А.Н. Крыловой было предложено производить поверочную реакцию на ртуть с этим экстрактом. Экспериментальная проверка данной методики показала, что наилучшими реагентами для разложения дитизоната ртути являются 0,25% раствор йода в 0,3% растворе йодида калия и 1,5% раствор тиосульфата натрия в 1 н растворе хлористоводородной кислоты.

Колориметрический метод достаточно длителен и трудоемок, требует приготовления и использования большого количества реактивов и связан с необходимостью обеспечения безопасности в работе, т.к. данным методом выполняются исследования ртутьсодержащего органического соединения. Показатели повторяемости и воспроизводимости результатов анализа, колориметрическим методом не всегда удовлетворяют требованиям, что приводит к необходимости проведения дополнительных аналитических исследований.

В литературе приводятся данные по определению ионов металлов с использованием сферических наночастиц серебра. В работе A. Castillo описано использование наночастиц серебра для спектрофотометрического определения ртути [8]. Дополнительную информацию о спектрофотометрических методах определения ртути можно найти в обзоре А. Башилова [9].

В большинстве случаев определение ртути основано на образовании ионных и(или) координационных связей между ионами металла и модификаторами наночастиц, поэтому выбор модификатора играет важную роль в регулировании чувствительности и селективности определения. В качестве спектрофотометрического метода определения ртути, согласно ГФ РФ, используется метод атомно-абсорбционной спектрометрии с беспламенной атомизацией (метод «холодного пара») [10]. Метод основан на специфической особенности ртути образовывать пар в элементарном состоянии при комнатной температуре [11]. Из ряда других инструментальных средств этот метод отличается редким сочетанием достоинств – предел обнаружения низких концентраций элемента, высокая селективность, возможность определения большого количества элементов, хорошая воспроизводимость, минимально необходимый объем пробы, сравнительно небольшая стоимость оборудования [12]. Это привело к тому, что в настоящее время атомно-абсорбционная спектрометрия является основным, а часто и арбитражным методом при определении содержания металлов в объектах окружающей среды.

В отличие от большинства химических методов атомно-абсорбционная спектрометрия обладает очень высокой селективностью определения [13]. Поэтому практически не требуется отделение сопутствующих элементов, поскольку их присутствие обычно не вызывает заметной систематической погрешности при определении содержимого анализируемого элемента. К недостаткам метода «холодного пара» следует отнести необходимость проведения многостадийной и зачастую, трудоемкой процедуры пробоподготовки для обеспечения полноты выхода ртути. Недостатком данного метода является также необходимость борьбы с эффектом «памяти» и ма-

тричных влияний в реакционном сосуде, коммуникациях и в аналитической кювете [14]. Этот метод применим в том случае, когда ртуть находится в неорганической форме. В случае органических субстанций, когда ртуть может входить в состав органических соединений, необходима минерализация последних.

В результате проведенных исследований [15, 16] выявлено, что при фармакопейном методе минерализации фармацевтических субстанций происходит практически полная потеря ртути. Из-за недостатков существующего фармакопейного метода определения тяжелых металлов для их количественного определения в субстанциях требуется другой способ пробоподготовки. В качестве одного из наиболее перспективных предложен метод микроволновой минерализации в закрытых сосудах, что позволяет значительно увеличить выход определяемого элемента.

Метод атомной абсорбции холодных паров обладает высокой чувствительностью и селективностью за счет отгонки паров элементной ртути от матрицы пробы. В то же время в работе Н.Б. Иваненко с соавт. [1] указано, что из-за невысокой производительности данные методы уступают место методу масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS).

Метод ICP-MS был разработан и развивался одновременно в трех странах: США (Ames Laboratory и университет штата Айова, США), Канаде (фирма Sciex), Великобритании (Университет Surrey) [16]. Сопряжение источника ионов на основе ICP и масс-анализатора квадрупольного типа позволило создать прибор, обеспечивающий элементный и изотопный анализ растворов с пределом обнаружения до 0,05 н г/м л для многих элементов. В РФ в 2003 г. утверждены и введены в действие МУК 4.1.1483-03 по определению содержания химических элементов, в том числе ртути, в биосубстратах методом ИСП-МС. Данный метод является одним из передовых методов в области элементного анализа. Количественный ИСП-МС анализ позволяет проводить одновременное определение более 70 элементов в широком диапазоне концентраций, вплоть до 10–6 масс.%.

Вместе с тем при количественном определении ртути методом ИСП-МС возникают некоторые трудности, обусловленные физико-химическими свойствами рассматриваемого элемента. Высокая летучесть ртути определяет необходимость консервирования образца на стадии отбора пробы. Ртуть также обладает очень высоким потенциалом ионизации (10,44 эВ), что при масс-спектрометрическом анализе существенно ограничивает эффективность ее ионизации в плазме и приводит к низкой чувствительности метода. Кроме того, существенное затруднение вызывает «эффект памяти». Данное мешающее влияние объясняется плохой смываемостью остаточных количеств ртути на подающих путях масс-спектрометра, распылительной камере и горелке, деталях интерфейса [7].

Наиболее предпочтительным методом разделения для анализа объектов, которые не обладают достаточной летучестью и термической устойчивостью, является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Большинство металлорганических соединений, встречающихся в природе, требуют при проведении ВЭЖХ предварительной дериватизации с целью получения летучих производных. Для разделения химических веществ, обладающих высокой, средней летучестью и термической стабильностью применяется газовая хроматография. На практике при определении металлорганических соединений в качестве детекторов используют атомно-эмиссионные спектрометры с микроволновой плазмой (МП-АЭС). В редких случаях при определении химических форм ртути применяют ААС и АФС. При необходимости проведения многоэлементного детектирования предпочтение отдается методу ионной хроматографии и масс-спектрометрии (ИСП-МС) [17].

Для идентификации форм связывания ртути применяют метод ВЭЖХ с детектированием методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением [18], а также ВЭЖХ ИСП-МС для подтверждения результатов. При этом предварительно изучают масс-спектры реперных соединений ртути с пептидами, которые, как правило, синтезируются непосредственно перед анализом ввиду их быстрого окисления кислородом воздуха.

ВЭЖХ – один из эффективных методов анализа и разделения сложных примесей. Так, например, примеси тяжелых металлов морепродуктов разделяют с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ), где подвижной фазой является цистеин (т.к. в рыбе метилртуть связана в комплекс с цистеином или соединением подобным цистеину по составу), используя колонку С-18 (при комнатной температуре) и детектируют с помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Общую ртуть вычисляют суммированием метилртути и неорганической ртути, определенных в вытяжках [30]. Для морепродуктов, содержащих

0,055–2,78 мг/кг метилртути и 0,014–0,137 мг/кг неорганической ртути, точность анализа составляет 0,5% (относительное стандартное отклонение) для метилртути и для неорганической ртути – 9%. Извлечение суммарного аналита составляет 94% для метилртути и 98% для неорганической ртути. Результаты по метилртути и неорганической ртути в эталоне согласованы с аттестованными значениями. Предел обнаружения в морепродуктах соствляет 0,007 мг/кг метилртути и 0,005 мг/кг неорганической ртути [18, 19].

На данный момент опубликован ряд методик определения многих субстанций и элементов в различных объектах с использованием электрохимических методов – полярографии, потенциометрии, постояннотоковой и дифференциально-импульсной вольтамперометрии на различных материалах индикаторных электродов, в том числе на электродах, в состав которых входят катионные красители, способные образовывать комплексы с некоторыми веществами [20, 21].

В последнее время широкое применение в аналитической химии получил вольтамперометрический анализ, который представляет собой группу электрохимических методов анализа, где используют процессы поляризации микроэлектрода и получают поляризационные (вольтамперометрические) кривые зависимости силы тока от напряжения. Во многих публикациях отражены результаты использования метода вольтамперометрии в аналитической химии лекарственных субстанций и препаратов [22].

Разработан метод импульсной инверсионной хронопотенциометрии, с помощью которого определяют концентрацию тяжелых металлов с отрицательным (Pb, Cu, Zn, Cd, Sn, Ni, Co, Fe, Mn) и положительным (Hg, As) потенциалами инверсии. Исследование проводится электрохимическим концентрированием на измерительном электроде ионов из раствора, а затем выполнением измерения потенциалов их растворения во времени (инверсии) по заданному сопротивлению в окислительной цепи. Для измерения концентрации ионов металлов с положительным потенциалом инверсии, к которым относится $Hg2^{+}$, условием завершения количественного процесса растворения анализируемого металла, является значение напряжения растворения. В работе во время измерения ртути по данным некоторых исследований [21, 24] использовали электрохимическую ячейку с золотым твердотельным измерительным электродом и сравнительным хлорсеребрянным. Данный импульсный метод позволяет обрабатывать электрохимический сигнал как в отрицательном, так и в положительном диапазоне потенциалов [23].

Заключение

Таким образом, наиболее перспективным представляется применение комбинированных и электрохимических методов выявления ртути, в биологических объектах и созданных на их основе ЛП, которые позволяют устанавливать зоны локализации аналита и исследовать вещественный состав соединений, образующихся в объектах живой природы. Это связано в первую очередь с тем, что такие методы, как спектрофотометрия в ультрафиолетовой области, рефрактометрия, хроматография в ряде случаев являются многостадийными и долговременными и требуют применения малодоступных реактивов и дорогостоящей аппаратуры. Наряду с этим ведется разработка электрохимических методов анализа, позволяющих повысить экспрессность и точность анализа по сравнению с указанными методами.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Иваненко Н.Б., Соловьев Н.Д., Иваненко А.А., Москвин Л.Н. Определение химических форм микроэлементов в биологических объектах. Аналитика и контроль. 2012; 16 (2): 12–5. [Ivanenko N.B., Soloviev N.D., Ivanenko A.A., Moskvin L.N. Determination of chemical forms of microelements in biological objects. Analytics and control. 2012; 16 (2): 12–5 (in Russian)].

2. Основы аналитической химии. Под ред. Ю.А. Золотова. 5-е изд., стер. М.: Академия, 2012; 2: 409. [Fundamentals of analytical chemistry Red. Yu.A. Zolotov. 5th ed., Sr. M.: Academy, 2012; 2: 409 (in Russian)].

3. Barrocas P.R.G., Landing W.M., Hudson R.J.M. Assessment of mercury (II) bioavailability using a bioluminescent bacterial biosensor: Practical and theoretical challenges. J. Environ. Sci. 2010; 22: 1137–43.

4. Woop M. Optimizing Tethered Particle Motion to Measure DNA Compaction by Protamine. Biophysical J. 2015; 108: 393a.

5. Shuvaeva O.V., Gustaytis M.A., Anoshin G.N. Mercury speciation in environmental solid samples using thermal release technique with atomic absorption detection. Anal. Chim. Acta. 2008; 621: 148–54.

6. Дедкова В.П., Швоева О.П., Саввин С.Б. Тест-метод определения ртути (II) дитизоном на твердой фазе волокнистого анионообменника. Журн. аналит. химии. 2004; 59 (4): 429–33. [Dedkova V.P., Shvoeva O.P., Savvin S.B. Test method for determination of mercury (II) by dithizone on the solid phase of a fibrous anion exchanger. Zhurn. analyte chemistry. 2004; 59 (4): 429–33 (in Russian)].

7. Спирова С.Н. Исследование содержания примесных элементов (кадмий, свинец, ртуть) в лекарственных средствах и сырье природного происхождения: автореферат дис. ... кандидата фармацевтических наук: 15.00.02. М., 1995; 24. [Spirova S.N. Investigation of the content of impurity elements (cadmium, lead, mercury) in medicines and raw materials of natural origin: abstract of thesis. ... Candidate of Pharmaceutical Sciences: 15.00.02. M., 1995; 24 (in Russian)].

8. Castillo A., Roig-Navarro A.F., Pozo O.J. Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples. Anal. Chim. Acta. 2006; 577: 18–25.

9. Башилов А. Определение тяжелых металлов в БАДах, лекарственных растениях, биологических жидкостях методами ААС, ИСП-ОЭС, ИСП-МС после микроволновой пробоподготовки. Химический анализ и медицина: сб. тез. I Всерос. конф. с междунар. участием (Москва, 9–12 ноября 2015 г.). М.: КАСКОН, 2015; 6–12. [Bashilov A. Determination of heavy metals in dietary supplements, medicinal plants, biological fluids by AAS, ICP-OES, ICP-MS methods after microwave sample preparation. Chemical analysis and medicine: collection of articles. mes. I Vseros. conf. from Intern. participation (Moscow, November 9–12, 2015). M.: KASKON, 2015; 6–12 (in Russian)].

10. Алемасова А.С., Рокун А.Н., Шевчук И.А. Аналитическая атомноабсорбционная спектроскопия. Донецк, 2003; 327. [Alemasova A.S., Rokun A.N., Shevchuk I.A. Analytical atomic absorption spectroscopy. Donetsk, 2003; 327 (in Russian)].

11. Белокаменская А.М., Ребезов М.Б., Мазаев А.Н., Ребезов Я.М., Максимюк Н.Н., Асенова Б.К. Исследование пищевых продуктов и продовольственного сырья на содержание ртути атомно-абсорбционным методом. Молодой ученый. 2013; 10: 98–101. URL https://moluch.ru/archive/57/7967/ (дата обращения: 24.12.2018). [Belokamenskaya A.M., Rebezov M.B., Mazaev A.N., Rebezov Ya.M., Maksimyuk N.N., Asenova B.K. Study of food products and food raw materials for mercury content by the atomic absorption method. Young Scientist. 2013; 10: 98–101. URL https://moluch.ru/archive/57/7967/ (appeal date: 12/24/2018) (in Russian)].

12. Атомно-абсорбционное определение ртути в объектах окружающей среды и биологических материалах: Сборник методических указаний. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004; 59. [Atomic absorption determination of mercury in environmental objects and biological materials: Collection of guidelines. M.: Federal center of state sanitary and epidemiological supervision of the Ministry of Health of Russia, 2004; 59 (in Russian)].

13. Elzinga E.J., Cirmo A. Application of sequential extractions and X-ray absorption spectroscopy to determine the speciation of chromium in Northern New Jersey marsh soils developed in chromite ore processing residue (COPR). J. Hazard. Mater. 2010; 183: 145–54.

14. Pesavento M., Alberti G., Biesuz R. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. Anal. Chim. Acta. 2009; 631: 129–41.

15. Макаренко Н.П., Ганебных Е.В. Пробоподготовка биологического материала для атомно-абсорбционного анализа. Гигиена и санитария. 2007; 3: 71–2. [Makarenko N.P., Ganebnykh E.V. Sample preparation of biological material for atomic absorption analysis. Hygiene and Sanitation. 2007; 3: 71–2 (in Russian)].

16. Zheng J., Shibata Y., Furuta N. Determination of selenoamino acids using two-dimensional ionpair reversed phase chromatography with on-line detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. Talanta. 2003; 59: 27–36.

17. Santos J.S. et al. Determination of organic and inorganic mercury species in water and sediment samples by HPLC on-line coupled with ICP-MS. Talanta. 2009; 80: 207–11.

18. Vidler D.S. et al. The determination of methylmercury in biological samples by HPLC coupled to ICP-MS detection. Appl. Organometal. Chem. 2007; 21: 303–10.

19. Кузубова Л.И., Шуваева О.В., Аношин Г.Н. Метилртуть в окружающей среде (распространение, образование в природе, методы определения). Новосибирск: ГПНТБ СО РАН, 2000; 82. [Kuzubova L.I., Shuvaeva O.V., Anoshin G.N. Methyl mercury in the environment (distribution, education in nature, methods of determination). Novosibirsk: GPNTB SB RAS, 2000; 82 (in Russian)].

20. Геворгян А.М., Куницына Ю.А., Пак Э.В., Артыков А.Т. Определение ртути и висмута в водах инверсионной вольтамперометрией. 17 Менделеевский съезд по общ. и прикл. химии, Казань, 21–26 сент. 2003. Т. 1. Пленар. докл. Достиж. и перспект. хим. науки: Тез. докл. Казань, 2003; 222. [Gevorgyan A.M., Kunitsyna Yu.A., Pak E.V., Artykov A.T. Determination of mercury and bismuth in waters by inversion voltammetry. 17 Mendeleev Congress on total. and applied Chemistry, Kazan, 21–26 Sep. 2003. T. 1. Plenar. report Achieve and perspective. chemical Science: Tez. Report. Kazan, 2003; 222 (in Russian)].

21. Мирошникова Е.Г., Малахова Н.А., Брайнина Х.З., Легоньков В.В., Максимов Ю.Г., Волконский А.Е. Системы для внелабораторного инверсионно-вольтамперометрического анализа. Всеросс. научн. конф. с международным участием «Электроаналитика-2005», Екатеринбург, 23–27 мая 2005: Тез. докл. Екатеринбург, 2005; 105. [Miroshnikova EG, Malakhov NA, Brainin Kh.Z., Legonkov VV, Maksimov Yu.G., Volkonsky A.E. Systems for off-laboratory inversion-voltammetric analysis. Vseoss. scientific conf. with international participation «Electroanalytics-2005», Ekaterinburg, May 23–27, 2005: Proc. Report. Ekaterinburg, 2005; 105 (in Russian)].

22. Матвейко Н.П., Брайкова А.М., Бушило К.А., Садовский В.В. Инверсионно-вольтамперометрический контроль содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье и препаратах на его основе. Вестник витебского государственного технологического университета. 2016; 1 (30): 82–5 [Matveyko N.P., Braykova A.M., Bushilo K.A., Sadovsky V.V. Inversion-voltammetric control of the content of heavy metals in medicinal plant materials and preparations based on it. Bulletin of the Vitebsk State Technological University. 2016; 1 (30): 82–5 (in Russian)].

23. Слепченко Г.Б., Мартынюк О.А., Постников П.С., Трусова М.Е., Бондарев А.А., Смирнов И.В., Быстрицкий Е.Л. Новые возможности вольтамперометрического определения фармацевтических препаратов на органомодифицированных электродах. Сибирский медицинский журнал №2`2009; 21–4. [Slepchenko G.B., Martynyuk O.A., Postnikov P.S., Trusova M.E., Bondarev A.A., Smirnov I.V., Bystritsky E.L. New features of voltammetric determination of pharmaceutical preparations on organomodified electrodes. Siberian medical journal № 2`200; 21–4 (in Russian)].

24. Галимова В. Электрохимический контроль микроколичеств ртути в воде. Вестник Львовского университета. Серия химическая. 2016; 57 (2): 588–92 [Galimov V. Electrochemical control of trace amounts of mercury in water. Bulletin of Lviv University. Chemical series. 2016; 57 (2): 588–92 (in Russian)].

***Поступила** 16 мая 2019 г.*
***Received** 16 May 2019*

***Принята к публикации** 10 сентября 2019 г.*
***Accepted** 10 September 2019*

https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-02

© Коллектив авторов, 2020
УДК 615.31:547.96].012.1

Синтез трипептида H–ProAla–Glu–OH и изучение его токсикологических свойств

Н.Д. Бунятян[1, 4], Г.М. Бобизода[2], О.А. Попова[1], М.М. Саповский[4], М. Самиев[2], А.Б. Прокофьев[1, 4], И.П. Ремезова[3], В.А. Евтеев[1]

[1]Научный центр экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8;

[2]Таджикский государственный педагогический университет им. С. Айни, Республика Таджикистан, 734003, Душанбе, ул. Рудаки, д. 121;

[3]Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета, Российская Федерация, 357532, Пятигорск, проспект Калинина, д. 11;

[4]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Российская Федерация, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бунятян Наталья Дмитриевна – заведующая кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), главный аналитик Научного центра экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: 8 (916) 797-07-72. E-mail: ndbun@mail.ru. *ORCID: 0000-0003-0936-5551*

Бобизода Гуломкодир Муккамал – профессор кафедры органической химии Таджикского государственного педагогического университета им. С. Айни, доктор биологических наук, доктор фармацевтических наук. Тел: +9 (9288) 887-79-17. E-mail: bobievgm@rambler.ru. *ORCID: 0000-0002-0753-211X*

Попова Ольга Анатольевна – начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 испытательного центра экспертизы лекарственных средств Научного центра экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ. Тел.: +7 (903) 788-85-56. E-mail: PopovaOA@expmed.ru. *ORCID: 0000-0003-2933-5632*

Саповский Михаил Михайлович – профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (985) 762-68-74. E-mail: michael.sapovsky@mpbio.com. *ORCID: 0000-0003-2835-2748*

Самиев Машариф – доцент кафедры химии Таджикского государственного педагогического университета им. С. Айни, кандидат химических наук. Тел: +9 (9291) 818-56-80. E-mail: samievmasharif@mail.ru

Прокофьев Алексей Борисович – директор Центра клинической фармакологии НЦЭСМП, профессор кафедры фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Сеченовского Университета, доктор медицинских наук, профессор. Тел.: +7 (965) 121-65-05. E-mail: prokofyev56@gmail.com. *ORCID: 0000-0001-7024-5546*

Ремезова Ирина Петровна – профессор кафедры токсикологической и аналитической химии Пятигорского медико-фармацевтического института (филиал Волгоградского ГМУ), доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (8793) 39-10-87. E-mail: i.p.remezova@pmedpharm.ru. *ORCID: 0000-0003-3456-8553*

Евтеев Владимир Александрович – старший аналитик Центра клинической фармакологии Научного центра экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ. Тел.: +7 (906) 771-27-16. E-mail: pharmchemist@gmail.com. *ORCID: 0000-0002-6150-5796*

РЕЗЮМЕ

Введение. Биологическая активность пептидов зависит от аминокислотного состава, поэтому низкомолекулярные пептиды в последние годы занимают наиболее видное место среди большого числа лекарственных препаратов. Это можно объяснить тем, что аминокислоты не являются чужеродными для живого организма и не вызывают побочных реакций. Важными условиями синтеза пептидов являются выбор боковых блокирующих групп, которые легко снимаются, и аминокислотного состава. Было высказано предположение, что увеличение в структуре дипептида числа функциональных групп приведет к повышению иммунобиологической активности трипептида. Для удлинения цепи между пролином и глутаминовой кислотой в качестве «мостика» выбрали аминокислоту аланин.

Цель исследования – разработка наиболее оптимальной схемы синтеза трипептида с последовательностью аминокислот H–Pro–Ala–Glu–OH и изучение свойств синтезированного соединения.

Материал и методы. Для получения трипептида использовали метод смешанных ангидридов и активированных эфиров. Синтез состоял из трех стадий: получение защищенного дипептида Boc–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH, его подготовка к синтезу трипептида и непосредственно синтез трипептида. Для идентификации синтезированного трипептида использовали ультрафиолетовую и инфракрасную

спектроскопию, высокоэффективную жидкостную хроматографию. Для синтезированного трипептида определяли острую и хроническую токсичность.

Результаты. Синтез трипептида осуществлен наращиванием пептидной цепи с С-конца. Аминогруппы аминокислот пролина и аланина защищали трет-бутилоксикарбонильной группой, которая лучше подходит для указанных аминокислот; γ-карбонильную группу глутаминовой кислоты – бензильной группой, которая легко удаляется гидрированием. Установлено, что синтезированный трипептид с последовательностью аминокислот H–Pro–Ala–Glu–OH в концентрации $1{\cdot}10^{-3}$ моль/л является малотоксичным соединением.

Заключение. Синтезирован новый малотоксичный трипептид с последовательностью аминокислот H–Pro–Ala–Glu–OH.

Ключевые слова: иммуноактивность, синтез пептидов, аминокислоты, пептидные биорегуляторы, пролин, аланин, острая и хроническая токсичность.

Для цитирования: Бунятян Н.Д., Бобизода Г.М., Попова О.А., Саповский М.М., Самиев М., Прокофьев А.Б., Ремезова И.П., Евтеев В.А. Синтез трипептида H–ProAla–Glu–OH и изучение его токсикологических свойств. Фармация, 2020; 69 (3): 11–17. ***https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-02***

SYNTHESIS OF THE TRIPEPTIDE H–ProAla–Glu–OH AND AN INVESTIGATION OF ITS TOXICOLOGICAL PROPERTIES

N.D. Bunyatyan[1, 4], G.M. Bobizoda[2], O.A. Popova[1], M.M. Sapovsky[4], M. Samiev[2], A.B. Prokofyev[1, 4], I.P. Remezova[3], V.A. Evteev[1]

[1]Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation, 8, Petrovsky Boulevard, Moscow 127051, Russian Federation;

[2]S. Aini Tajik State Pedagogical University, 121, Rudaki St., Dushanbe 734003, Republic of Tajikistan;

[3]Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch, Volgograd State Medical University, 11, Kalinin Prospect, Pyatigorsk 357532, Russian Federation;

[4]I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8, build. 2, Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Bunyatyan Natalya Dmitrievna – Head of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Sechenov University, chief analyst of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (916) 797-07-72. E-mail: ndbun@mail.ru. ***ORCID: 0000-0003-0936-5551***

Bobizoda Gulomkodir Mukkamal – Professor of the Department of Organic Chemistry of the Tajik State Pedagogical University named after S. Aini, Doctor of Biological Sciences, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +9 (9288) 877-77-17. E-mail: bobievgm@rambler.ru. ***ORCID: 0000-0002-0753-211X***

Popova Olga Anatolyevna – Head of the Laboratory of Chemical and Pharmaceutical Preparations №2 of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Tel.: +7 (903) 788-85-56. E-mail: PopovaOA@expmed.ru. ***ORCID: 0000-0003-2933-5632***

Sapovsky Mikhail Mikhailovich – Professor of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Sechenov University, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (985) 762-68-74. E-mail: michael.sapovsky@mpbio.com. ***ORCID: 0000-0003-2835-2748***

Samiev Masharif – Associate professor of the Department of chemistry of the TSPU named after S. Aini, PhD (chemical sciences). Tel.: +9 (9291) 818-56-80. E-mail: samievmasharif@mail.ru

Prokofiev Aleksey Borisovich – Director of the Center for Clinical Pharmacology of the SCEEMP, Professor of the Department of Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases of the Sechenov University, Doctor of Medical Sciences, Professor. Tel.: +7 (965) 121-65-05. E-mail: prokofyev56@gmail.com. ***ORCID: 0000-0001-7024-5546***

Remezova Irina Petrovna – Professor of the Department of Toxicological and Analytical Chemistry of the Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute (Volgograd State Medical University Branch), Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (8793) 39-10-87. E-mail: ipremezova@pmedpharm.ru. ***ORCID: 0000-0003-3456-8553***

Evteev Vladimir Aleksandrovich – Senior Analyst of the Center for Clinical Pharmacology of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Tel.: +7 (906) 771-27-16. E-mail: evteevVA@expmed.ru. ***ORCID: 0000-0002-6150-5796***

SUMMARY

Introduction. The biological activity of peptides depends on the amino acid composition; therefore, low-molecular-weight peptides have recently occupied the most prominent place among a large number of drugs. This is attributable to the fact that amino acids are not foreign to a living organism and that they do not cause adverse reactions. The important conditions for the synthesis of peptides are the choice of side blocking groups that are easily removable, as well as that of the amino acid composition. It has been suggested that an increased number of functional groups in the structure of a dipeptide will lead to the enhanced immunobiological activity of a tripeptide. The amino acid alanine has been chosen as a bridge to extend the chain between proline and glutamic acid.

Objective: to develop the most optimal scheme for the synthesis of a tripeptide with the amino acid sequence H–Pro–Ala–Glu–OH and to investigate the properties of the synthesized compound.

Material and methods. A method of mixed anhydrides and activated esters was used to prepare a tripeptide. The synthesis involved three steps: the formation of the protected dipeptide Boc–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH, its preparation for the synthesis of a tripeptide, and per se the synthesis of the tripeptide. UV and IR spectroscopies and HPLC were employed to identify the synthesized tripeptide, the acute and chronic toxicities of which were determined.

Results. The tripeptide was synthesized through peptide elongation from the C-terminus. The amino groups of the amino acids proline and alanine were protected by a tert-butyloxycarbonyl group that is better suited for the above amino acids; the γ-carbonyl group of glutamic acid was protected by a benzyl group that is easily removed by hydrogenation. The synthesized tripeptide with the amino acid sequence H–Pro–Ala–Glu–OH at a concentration of $1{\cdot}10^{-3}$ mol/L was found to be a low toxic compound.

Conclusion. A new low toxic tripeptide with the amino acid sequence H–Pro–Ala–Glu–OH was synthesized.

Key words: immunoactivity, peptide synthesis, amino acids, peptide bioregulators, proline, alanine, acute and chronic toxicity.

For reference: Bunyatyan N.D., Bobizoda G.M., Popova O.A., Sapovsky M.M., Samiev M., Prokofyev A.B., Remezova I.P., Evteev V.A. Synthesis of the tripeptide H–ProAla–Glu–OH and the investigation of its toxicological properties. Farmatsiya, 2020; 69 (3): 11–17. ***https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-02***

Введение

В последние годы низкомолекулярные пептиды занимают важное место среди лекарственных препаратов (вилон, тимоген, тимогар, тимоцин, тимофер и др.). Прежде всего это объясняется тем, что они не являются чужеродными для живого организма и практически не вызывают побочных реакций. Биологическая активность пептидов обуславливается их аминокислотным составом [1–4]. Важным условием синтеза пептидов является выбор боковых защитных групп и их селективное отщепление. Ранее опубликованные работы [5–6] указывают на повышенное внимание ученых к методу активированных эфиров с использованием п-нитрофенола (HONp) в качестве активатора карбоксильных групп аминокислот. С помощью таких эфиров был получен ряд пептидов с достаточно высоким выходом и чистотой [7–9].

Известный иммуноактивный дипептид тимоген в своей структуре содержит глутаминовую кислоту, в составе дипептидов тимоген и тимогар имеется остаток триптофана, содержащего индольную группу, имеющую в структуре пятичленный гетероцикл. Анализ этих данных позволил предположить, что для синтеза нового трипептида целесообразно использовать глутаминовую кислоту, а также аминокислоту пролин, которая содержит пятичленный гетероцикл. Для удлинения цепи между пролином и глутаминовой кислотой в качестве мостика можно выбрать аминокислоту аланин. Теоретически возможно предположить, что увеличение в структуре трипептида количества функциональных групп, приведет к повышению его иммунобиологической активности за счет реакций взаимодействия функциональных групп с рецепторами организма.

Целью наших исследований явилась разработка схемы синтеза трипептида с последовательностью аминокислот H-Pro-Ala-Glu-OH.

Материал и методы

Для получения трипептида использовали метод смешанных ангидридов и активированных эфиров. Методика синтеза трипептида H–Pro–Ala–Glu–OH включала три этапа. На первом этапе получали защищенный дипептид Boc–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH. Для этого 3,21 г H–Glu-(γ-Bzl)–OH растворяли в 11,5 мл натрия гидроксида и добавляли 20 мл диоксана. Полученную смесь упаривали на роторном испарителе, к полученному маслянистому продукту добавляли 4,2 г Boc–Ala–ONp, растворенного в 20 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 3 ч. Растворитель упаривали на роторном испарителе. Полученный после упаривания маслянистый продукт растворяли в 50 мл 0,5 н натрия гидрокарбоната и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатные вытяжки отбрасывали, а водный слой подкисляли 1н серной кислотой до pH=2–3, снова экстрагировали этилацетатом. Этилацетатные вытяжки промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Этилацетатный слой отделяли от водного и упаривали на роторном испарителе. Получали 3,7 г маслянистого продукта.

Второй этап заключался в подготовке защищенного дипептида Boc–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH к следующему этапу синтеза трипептида. Для этого необходимо было получить хлоргидрад защищенного дипептида Boc–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH, чтобы далее запускать его в реакцию с третьей защищенной аминокислотой Boc–Pro–ONp. С этой целью 6,8 г Boc–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH растворяли в этилацетате и добавляли 10 мл HCl в эфире. Полученную смесь оставляли на ночь в холодильнике, затем осаждали смесью гексана с эфиром (1:3). Выпавший в осадок продукт декантировали эфиром и сушили в вакууме. В результате получали маслянистый продукт.

На третьем этапе проводили непосредственно синтез искомого трипептида Boc–Pro–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH. Для этого защищенный дипептид Boc–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH запускали в реакцию с защищенной аминокислотой Boc–Pro–ONp: 7,5 г HCl: H–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH растворяли в 20 мл диоксана, добавляли 16,7 мл 1 н натрия гидроксида и 20 мл изопропилового спирта. Смесь упаривали на роторном испарителе. К полученному маслянистому продукту добавляли 3,3 г Boc–Pro–ONp, растворенного в 20 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 6 дней. Затем смесь упаривали на роторном испарителе. Оставшийся маслянистый продукт растворяли в 50 мл воды и экстрагировали эфиром. Эфирные вытяжки отбрасывали, а водный слой подкисляли 1,0 н серной кислотой до pH=2–3 и снова экстрагировали этилацетатом. Этилацетатные вытяжки объединили, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Затем растворитель удаляли на роторном испарителе. На данном этапе получали искомый защищенный трипептид-Boc–Pro–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH в виде маслянистого продукта.

Высокий выход искомого трипептида при синтезе обеспечивали благодаря использованию метода смешанных эфиров. На промежуточных этапах синтеза трипептида применяли трет-бутилоксикарбонильную (t-Boc) защиту для аминогрупп аминокислот пролина и аланина, а также бензильную защиту для блокирования γ-карбонильной группы глутаминовой кислоты.

Ход реакций конденсации, индивидуальность и чистоту полученных соединений контролировали методом тонкослойной хроматографии на хроматографических пластинках Silufol UV-254 (Чехия) и Merck, Kieselgel-60 (Германия) в нескольких системах растворителей (табл. 1).

Изучение УФ-спектров, расчет удельных показателей поглощения аминокислот и полученных пептидов проводили согласно ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области» ГФ РФ XIV изд.

Исследование токсичности полученного трипептида проводили на кроликах согласно методике, представленной в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией А.Н. Миронова [10]. Гематологические и биохимические исследования сыворотки крови проводились на 31-й и 90-й дни исследования. В крови животных определяли содержание гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов, моноцитов. В сыворотке крови определяли содержание общего белка, общего билирубина, холестерина и мочевины. Гематологические показатели определяли в цельной крови с антикоагулянтом на гематологическом анализаторе Picoscale (Венгрия). Содержание гемоглобина определяли цианметгемоглобиновым методом [11]. Мазки для лейкоцитарной формулы окрашивались по Романовскому–Гимзе с подсчетом не менее 100 клеток с использованием микроскопа Р-16 Биолам. Биохимические показатели крови определяли по общепринятым методикам [11].

Таблица 1

Системы растворителей, используемые для контроля синтезированного трипептида

Table 1

Solvent systems used to control the synthesized tripeptide

Система	Состав	Соотношение компонентов
А	Хлороформ-метанол-уксусная кислота	18:2:1
Б	Хлороформ-метанол-уксусная кислота	60:45:20
В	Этилацетат-бензол	3:2
Г	Хлороформ-этилацетат-метанол-уксусная кислота	9:3:1:0,3
Д	Хлороформ-метанол-уксусная кислота	32:2:1
Е	Н-бутанол-пиридин-уксусная кислота-вода	30:20:6:24

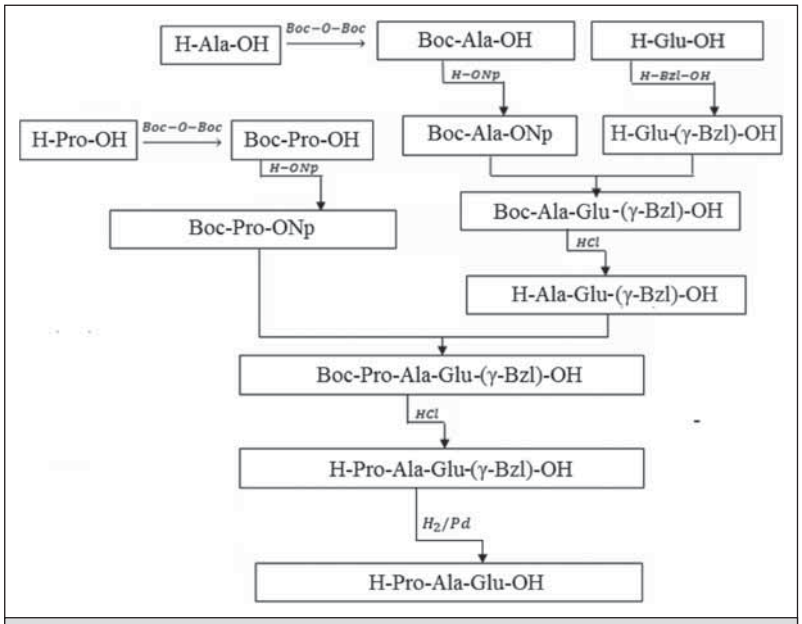


Рис. 1. Схема синтеза свободного трипептида H–Pro–Ala–Glu–OH

Fig. 1. The scheme for synthesis of the free tripeptide H–Pro–Ala–Glu–OH

Результаты и обсуждение

Синтез трипептида осуществлен наращиванием пептидной цепи с С-конца (рис. 1). Чистота всех полученных продуктов контролировалась с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ).

На первой стадии взаимодействием трет-бутилоксикарбонила на аланин был получен трет-бутилоксикарбонил аланин (Boc–Ala–OH). Затем при действии HONp на трет-третбутилоксикарбонилаланин методом смешанных ангидридов синтезировали п-нитрофениловый эфир

трет-бутилоксикарбонилаланин (Boc–Ala–ONp). Получение трет-бутилоксикарбонилаланил-γ-бензилового эфира глутаминовой кислоты было осуществлено методом активированных эфиров [12] по схеме:

Boc–Ala–ONp+H-Glu-(γ-Bzl)–OH→
→Boc–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH

Выход защищенного дипептида Boc–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH составил 68,4% (3,7г); Rf=0,65 (система А); Rf=0,69 (система Б); Rf=0,53 (система Д).

Далее был синтезирован трет-бутилоксикарбонилпролин. Защита его карбоксильной группы с одновременной активацией был осуществлен действием пара-нитрофенола в присутствии изобутилхлорформиата – таким образом получили активированный эфир трет-бутилоксикарбонилпролина – Boc–Pro–ONp. Выход 81,1%; Rf=0,4 (система Б).

Синтез защищенного трипептида Boc–Pro–Ala–Glu-(γ-Bzl)-OH проводили по схеме:

$$\text{Boc–Pro–ONp} + [\text{H–Ala–Glu-(}\gamma\text{-Bzl)–OH}] \xrightarrow{-\text{HO–C}_6\text{H}_4\text{NO}_2} \xrightarrow{-\text{HO–C}_6\text{H}_4\text{NO}_2} \text{Boc–Pro–Ala–Glu-(}\gamma\text{-Bzl)–OH}$$

Выход трипептида по этой схеме составлял 35,8%, (1,79 г). Rf=0,82 (система А); Rf=0,95 (система Б); Rf=0,88 (система Е).

Идентификацию полученных пептидов проводили по величине удельного показателя поглощения. Для этого измеряли спектры аминокислот и полученных пептидов. Спектр трипептида H–Pro–Ala–Glu–OH (рис. 2) характеризуется наличием одного максимума в области 254±2. Аналогично измеряли спектры поглощения аминокислот и полученных пептидов. Затем рассчитывали их удельный показатель поглощения (табл. 2).

В ИК-спектрах обнаружены полосы поглощения 730 см$^{-1}$, соответствующие деформационным колебаниям монозамещенного бензольного кольца; 1040, 1090, 1210 см$^{-1}$ – колебания CO в COOR; 1320, 1370 см$^{-1}$-валентные колебания C–N в CO–NH (амид III); 1480 см$^{-1}$-валентные колебания C=0 в бензольном кольце; 1570 см$^{-1}$-деформационные колебания NH в CO–NH (амид I); 1630, 1710 см$^{-1}$, 2910 см$^{-1}$-деформационные колебания CH- и CH2-групп. Таким образом, метод ИК-спектрометрии подтверждает структуру полученных веществ и может использоваться для их идентификации.

Свободный трипептид H-Pro-Ala-Glu-OH был получен гидрированием защищенного трипептида Boc–Pro–Ala–Glu-(γ-Bzl)–OH на палладиевом катализаторе с последующим удалением Boc-группы действием 0,01 н раствора соляной кислоты в этилацетате. Полноту удаления защитных групп контролировали при помощи ТСХ.

Чистоту полученного трипептида устанавливали с помощью метода ВЭЖХ. Условия хроматографирования: колонка μ Бондапак С18 (или аналогичная) 4 мм × 30 см, размер частиц 5 мкм;

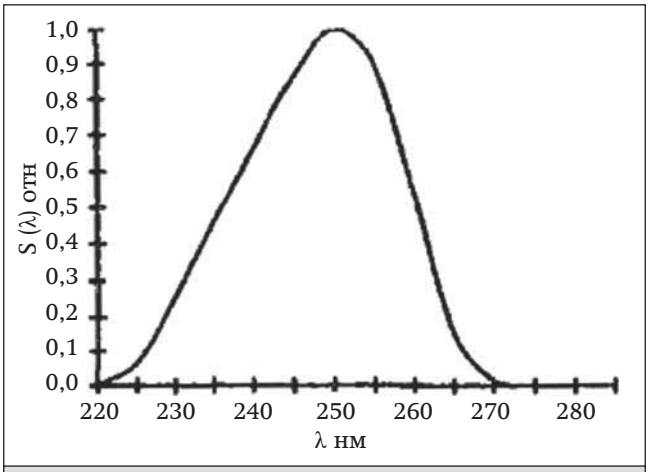


Рис. 2. УФ-спектр трипептида H–Pro–Ala–Glu–OH
Fig. 2. The UV spectrum of the tripeptide H–Pro–Ala–Glu–OH

Таблица 2

Показатели удельного поглощения для ароматических и гетроциклических аминокислот и некоторых содержащих их пептидов

Table 2

Specific absorption indices for aromatic and heterocyclic amino acids and some of their peptides

Соединение	Максимум светопоглощения, нм	$A\frac{1\text{ см}}{1\%}$
Триптофан	278±2	254,90
Изолейцил-триптофана	278±2	100,00
Гамма-глутамил-триптофан	279±2	142,00
Тирозин	275±2	74,03
Аспарагинил-тирозин	275±2	45,90
Пролин	254±2	254,00
Пролил-аланил-глутаминовая кислота	254±2	152,00

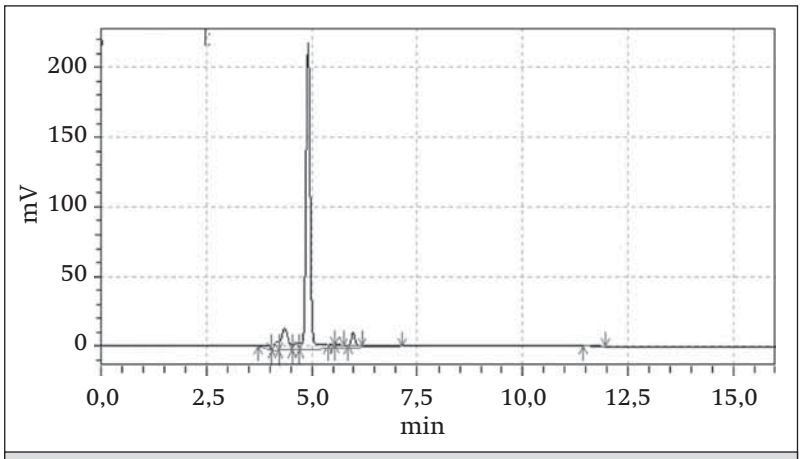


Рис. 3. Хроматограмма трипептида H–Pro–Ala–Glu–OH
Fig. 3. Chromatogram of the tripeptide H–Pro–Ala–Glu–OH

подвижная фаза метанол-вода 50:50, скорость потока 2,0 мл/мин, детектор спектрофотометрический, длина волны 254 нм, время элюирования 30 мин. На хроматограмме (рис. 3) наблюдается один основной пик вещества и два минорных пика. Время удерживания трипептида составляет 5 мин.

Изучение острой токсичности проводили на кроликах массой тела 2–4 кг, животных разделяли на 4 группы по 4 кролика в каждой. Для определения использовали водный раствор трипептида H-Pro-Ala-Glu-OH в концентрации $1{\cdot}10^{-3}$ моль/л. Кроликам 1-й группы внутримышечно вводили трипептид по 2 мг/кг, 2-й – по 2,8 мг/кг, 3-й – по 4,0 мг/кг. Кроликам контрольной 4-й группы внутримышечно вводили по 15 мг/кг физиологического раствора. Трипептид и физиологический раствор вводили один раз в сутки в течение 30 дней. Наблюдение за животными осуществлялось ежедневно с первого дня введения трипептида в течение 90 дней. Учитывалось внешнее поведение животных, отношение к корму, подвижность, состояние шерстного покрова и слизистых оболочек.

Наблюдение за животными в течение 90 дней эксперимента не выявило отличий между животными контрольной и опытных групп. В течение всего эксперимента экспериментальные животные оставались живыми, температура тела находилась в пределах физиологической нормы, масса тела кроликов равномерно увеличивалась, однако это увеличение не было статистически значимым. Статистически значимых различий, связанных с полом животных, не выявлено. Увеличение дозы трипептида с последовательностью аминокислот H–Pro–Ala–Glu–OH в группах животных также не оказывало влияния на динамику массы тела животных. Эксперименты на кроликах подтвердили полученные данные о том, что многократное (в течение 120 дней) ежедневное внутримышечное введение трипептида в дозах 4 и 40 мкг/кг эквивалентно 10-кратной терапевтической дозе для человека с учетом межвидового переноса доз не приводит к изменениям в общем состоянии животных и не оказывает токсического действия на организм.

Хроническую токсичность трипептида также изучали на кроликах. Препарат вводили 1 раз в сутки в течение 30 дней в дозах 8, 40 и 80 мкг/кг, соответствующих 5- и 10-кратной терапевтической дозе с учетом дози тимогена для человека и межвидового переноса доз (Freireich E.J. et al., 1966), после чего наблюдали за животными в течение 60 дней. Общий период наблюдения составлял 90 дней. Синтезированный трипептид не оказывал отрицательного воздействия на показатели общего состояния животных, динамику массы тела, клинические и биохимические показатели крови, что свидетельствовало об отсутствии у трипептида общетоксических свойств.

Полученные результаты исследования острой и хронической токсичности синтезированного соединения свидетельствовали о том, что трипептид с последовательностью аминокислот H-Pro-Ala-Glu-OH в концентрации $1{\cdot}10^{-3}$ моль/л является малотоксичным соединением и соответствует 5-му классу токсичности [10, 11, 14, 15].

Заключение

В ходе экспериментальных исследований был синтезирован новый малотоксичный трипептид с последовательностью аминокислот H-Pro-Ala-Glu-OH. Разработанная схема синтеза данного трипептида является оптимальной, поскольку она позволяет получить субстрат, дающий хороший выход продуктов реакции на всех трех этапах синтеза.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Пептидные тимомиметики. СПб.: Наука, 2000; 158.

2. Бунятян Н.Д., Холназаров Б.М., Бобизода Г.М. и др. Синтез и некоторые фармакологические свойства иммуноактивного лизинсодержащего тетрапептида. Химико-фармацевтический журнал. 2018; 7: 22–5.

3. Шабаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы). СПб.: Наука, 2003; 222.

4. Козихонов А.У., Джулаев У.Н., Раджабов У.Р. и др. Исследование процессов образования координационных соединений цинка (II) с аминокислотами. Доклады академии наук Республики Таджикистан. 2015; 58 (7): 608–14.

5. Миразоров К.И., Бобизода Г.М., Юлдошев Х. Применение пентафторфениловых эфиров при синтезе дипептида и сравнение биологических свойств. Известия Академии наук Республики Таджикистан. 2018; 1 (200): 42–5.

6. Бунятян Н.Д., Бобиев Г.М. Исследование координации иммуноактивных пептидов с ионами металлов как основы для разработки инновационных лекарственных препаратов. Фармация и фармакология. 2014; 2: 66–75.

7. Холназаров Б.М., Бунятян Н.Д., Бобиев Г.М. и др. Синтез потенциально иммуноактивных лизинсодержащих пептидов. Доклады Академии наук Республики Таджикистан. 2013; 56 (6): 476–9.

8. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Л.: Наукова думка, 1992; 360.

9. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Охманович К.А. и др. Получение H-Phe-D-Trp-Lys(-Boc)-Thr-OMe – тетрапептидного фрагмента синтеза аналогов соматостатина. Российский биотерапевтический журнал. 2011; 10 (4): 43–5.

10. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012; 944.

11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. (под ред. Р.У. Хабриева). М.: Медицина, 2005; 832.

12. Бобиев Г.М. Синтез тимопентина и его аналогов методом активированных эфиров. Вестник педагогического университета (Душанбе), 1997; 6: 12–7.

13. Бобиев Г.М., Бунятян Н.Д., Холназаров Б.М. Разработка условий хроматографического определения дипептида изолейцил-триптофана и его координационных соединений. Фармация. 2009; 7: 17–8.

14. Холназаров Б.М., Бунятян Н.Д., Олефир Ю.В. и др. Токсические и иммуномодулирующие свойства координационного соединения дипептида изолейцил-триптофан с ионами железа (II). Химико-фармацевтический журнал. 2017; 6: 26–8.

15. Сагитова М.Г., Камалиев А.Р., Асрутдинова Р.А., Джавадов Э.Д. Определение острой токсичности препаратов. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, 2013; 25 (3): 298–302.

REFERENCES

1. Morozov V.G., Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Peptide thymomimetics. Sankt-Peterburg: Nauka; 2000; 158 (in Russian).

2. Bunyatyan N.D., Kholnazarov B.M., Bobizoda G.M. et al. Synthesis and some Pharmacological Properties of an Immunoactive Lysine-Containing Tetrapeptide. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal. 2018; 7: 22–5 (in Russian).

3. Shabaeva L.K., Khavinson V.Kh., Ryadnova I.Yu. Peptide self-regulation of living systems (facts and hypotheses). Sankt-Peterburg: Nauka, 2003; 222 (in Russian).

4. Kozikhonov A.U., Dzhulaev U.N., Radjabov U.R. et al. Investigation of the formation of coordination compounds of zinc (II) with amino acids. Dokladi akademii nauk Respubliki Tadzkhikistan. 2015; 58 (7): 608–14 (in Russian).

5. Mirazorov K.I., Bobizoda G.M., Yuldoshev Kh. Use of pentafluorophenyl ethers in the synthesis of dipeptide and comparison of biological properties. Izvestiya akademii nauk Respubliki Tadzkhikistan. 2018; 1 (200): 42–5 (in Russian).

6. Bunyatyan N.D., Bobiev G.M. A study of the coordination of immunoactive peptides with metal ions as the basis for the development of innovative drugs. Farmatsiya i farmakologiya. 2014; 2: 66–75 (in Russian).

7. Kholnazarov B.M., Bunyatyan N.D., Bobiev G.M. et al. Synthesis of potentially immunoactive lysine-containing peptides. Dokladi akademii nauk Respubliki Tadzkhikistan. 2013; 56 (6): 476–9 (in Russian).

8. Gershkovich A.A., Kibirev V.K. Chemical synthesis of peptides. L.: Naukova dumka, 1992; 360 (in Russian).

9. Balaev A.N., Osipov V.N., Okhmanovich K.A. et al. Obtaining H-Phe-D-Trp-Lys (-Boc) -Thr-OMe – a tetrapeptide fragment of the synthesis of somatostatin analogues. Rossiiskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2011; 10 (4): 43–5 (in Russian).

10. Mironov A.N., Bunyatyan N.D., Vasiliev A.N. et al. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part 1. Moscow: Grif & K, 2012; 944 (in Russian).

11. Guidance on the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances (by ed. R.U. Khabriev). M.: Meditsina, 2005; 832 (in Russian).

12. Bobiev G.M. Synthesis of thymopentin and its analogues by the method of activated esters. Vestnik pedagogicheskogo universiteta (Dushanbe). 1997; 6: 12–7 (in Russian).

13. Bobiev G.M., Bunyatyan N.D., Kholnazarov B.M. Development of the conditions for the chromatographic determination of the isoleucyl tryptophan dipeptide and its coordination compounds. Farmatsiya. 2009; 7: 17–8 (in Russian).

14. Kholnazarov B.M., Bunyatyan N.D., Olefir Yu.V. et al. Toxic and immunomodulating properties of the complex of the isoleucyl-tryptophan dipeptide with iron (II) ions. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal. 2017; 6: 26–8 (in Russian).

15. Sagitova M.G., Kamaliev A.R., Asrutdinova R.A., Javadov E.D. Determination of acute toxicity of drugs. Uchenie zapiski Kazanskogoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsini im. N.E. Bauman. 2013; 25 (3): 298–302 (in Russian).

***Поступила** 10 октября 2019г.*
***Received** 10 October 2019*

***Принята к публикации** 31 января 2020 г.*
***Accepted** 31 January 2020*

https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-03

© Коллектив авторов, 2020
УДК 615.322:615.214.3].074

Изучение аминокислотного состава ноотропного сбора

Е.А. Доровских, В.А. Ермакова, Т.Ю. Ковалева

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Российская Федерация, 119048, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Доровских Екатерина Анатольевна – аспирант кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (ПМГМУ им. И.М. Сеченова) (Сеченовский Университет) . Тел.: +7 (915) 014-67-29. E-mail: 5ksusha5@mail.ru. *ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2741-1796*

Ермакова Валентина Алексеевна – профессор кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (905) 746-39-36. E-mail: ermakova1701@yandex.ru. *ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0006-5002*

Ковалева Татьяна Юрьевна – доцент кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 321-68-04. E-mail: tatyana_kovaleva_75@inbox.ru. *ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5961-9030*

РЕЗЮМЕ

Введение. Число пациентов, нуждающихся в лекарственных средствах ноотропного действия, постоянно растет как в России, так и во всем мире. В связи с этим является актуальной разработка эффективных и безопасных лекарственных средств для лечения и профилактики данных заболеваний. Химический скрининг сбора и отдельных его компонентов показал присутствие в них азотистых соединений, в том числе аминокислот. Учитывая важную роль аминокислот для функционирования нервной системы, представляет научный и практический интерес более детальное изучение биологически активных соединений этой группы.

Цель исследования – изучение качественного и количественного состава свободных и связанных аминокислот сбора ноотропного действия.

Материал и методы. Объектом исследований служил воздушно-сухой измельченный сбор ноотропного действия. Детальный качественный и количественный анализ проведен методами ТСХ и ВЭЖХ с применением предколоночной дериватизации образцов и разделением аминокислот методом обращенно-фазовой хроматографии с применением флюорометрического детектора по методике WatersAccQTag.

Результаты. Аминокислотный состав сбора ноотропного действия представлен 16 аминокислотами в свободном и связанном виде, 7 из которых – незаменимые. Суммарное содержание свободных аминокислот составило 1,165%, а связанных – 3,216%.

Заключение. В результате изучения биологически активных веществ сбора ноотропного действия было получены данные по составу и количественному содержанию аминокислот.

Ключевые слова: ноотропные препараты, сбор лекарственных растений, аминокислоты, метод WatersAccQTag.

Для цитирования: Доровских Е.А., Ермакова В.А., Ковалева Т.Ю. Изучение аминокислотного состава ноотропного сбора. Фармация, 2020; 69 (3): 18–22. *https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-03*

INVESTIGATION OF THE AMINO ACID COMPOSITION OF A NOOTROPIC HERBAL TEA

E.A. Dorovskikh, V.A. Ermakova, T.Yu. Kovaleva

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119048, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Dorovskikh Ekaterina Anatolyevna – postgraduate Student of Department of the Pharmaceutical Natural Science, Institute of Pharmacy of Sechenov University. Tel.: +7 (915) 014-67-29. E-mail: 5ksusha5@mail.ru. *ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2741-1796*

Ermakova Valentina Alekseevna – professor of Department of the Pharmaceutical Natural Science, Institute of Pharmacy of Sechenov University, Doctor Pharmaceutical Science, Professor. Tel.: +7 (905) 746-39-36. E-mail: ermakova1701@yandex.ru. *ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0006-5002*

Kovaleva Tatiana Yuryevna – dotsent of Department of the Pharmaceutical Natural Science, Institute of Pharmacy of Sechenov University, PhD Pharmaceutical Science. Tel.: +7 (916) 321-68-04. E-mail: tatyana_kovaleva_75@inbox.ru. *ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5961-9030*

SUMMARY

Introduction. The number of patients who need nootropic drugs is constantly growing both in Russia and around the world. In this connection, it is relevant to design effective and safe medicines for the treatment and prevention of these diseases. Chemical screening of a nootropic herbal tea and its individual components has shown that they contain nitrogenous compounds, including amino acids. Taking into account the important role of amino acids in the functioning of the nervous system, a more detailed study of this group of biologically active compounds is of scientific and practical interest.

Objective: to investigate the qualitative and quantitative composition of free and bound amino acids in the nootropic herbal tea.

Material and methods. The investigation object was an air-dry ground nootropic herbal tea. A detailed qualitative and quantitative analysis was carried out by TLC and HPLC with pre-column derivatization of samples and separation of amino acids by reversed-phase chromatography on a fluorometric detector, by applying the Waters AccQ Tag method.

Results. The amino acid composition of a nootropic herbal tea was represented by 16 amino acids in free and bound forms, 7 of which were essential. The total content of free and bound amino acids was 1.165 and 3.216%, respectively.

Conclusion. The investigation of biologically active substances in the nootropic herbal tea provided data on the composition and quantitative content of amino acids.

Key words: nootropic drugs, herbal tea, amino acids, Waters AccQ Tag method.

For reference: Dorovskikh E.A., Ermakova V.A., Kovaleva T.Yu. Investigation of the amino acid composition of a nootropic herbal tea. Farmatsiya, 2020; 69 (3): 18–22. ***https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-03***

Введение

Число пациентов, нуждающихся в лекарственных средствах ноотропного действия, постоянно растет как в России, так и во всем мире. Это связано как с увеличением числа лиц пожилого возраста, так и с неблагоприятными экологическими факторами, отсутствием здорового образа жизни и непрерывным стрессом у более молодых людей. Согласно данным ВОЗ, в 2016 г. нарушения мозгового кровообращения привели к смерти почти 6 млн человек [1]. В связи с этим является актуальной разработка эффективных и безопасных лекарственных средств для лечения и профилактики данных заболеваний. Лекарственные растительные препараты отличаются комплексностью действия, а также относительной безопасностью в сравнении с синтетическими препаратами. На кафедре фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) был разработан состав сбора ноотропного действия, в который входят 5 видов лекарственного растительного сырья, принадлежащего к различным морфологическим группам. Фармакологическая активность сбора была доказана в ходе доклинических исследований.

Как свидетельствуют данные научной литературы и результаты изучения химического состава сбора, в него входят биологически активные вещества различных групп, доминирующими из которых являются фенольные соединения. Химический скрининг сбора и отдельных его компонентов показал присутствие в них азотистых соединений, в том числе аминокислот. Учитывая важную роль, которую играют аминокислоты в жизнедеятельности растительных и животных организмов, представляет научный и практический интерес более детальное изучение этой группы биологически активных соединений.

В настоящее время известно, что аминокислоты являются важнейшим строительным материалом во всех клетках организма. Помимо участия в синтезе белка и ферментов, они выполняют функции нейромедиаторов или являются их предшественниками, регулируют и участвуют в обменных процессах, работе ЦНС, иммунной и гормональной систем. Недостаток той или иной аминокислоты может сказываться на функционировании всего организма в целом, в том числе вызывать психические расстройства, нарушать работу сердечно-сосудистой системы, мозга и снижать умственную активность и память [2]. Аминокислоты, по современным представлениям, регулируют уровень кальция в нервных клетках, стимулируют кровообращение в нервной ткани, экспрессию рецепторного аппарата, подавляют процессы перекисного окисления липидов [3]. Некоторые аминокислоты являются природными антиоксидантами – цистеин, глицин, пролин, β-аланин, таурин и др. [4].

Глицин – естественный медиатор центральной нервной системы, который сочетает ноотропный эффект с мягким седативным действием. В составе одноименного лекарственного препарата назначается при ишемии, гипоксии мозга и для лечения неврозов [5]. Аргинин способствует улучшению клинического состояния больных ишемической болезнью сердца, сни-

жает вязкость крови и уменьшает риск тромбоза сосудов. Глутаминовая кислота поддерживает дыхание клеток головного мозга, ее применяют при лечении некоторых нервных и психических заболеваний [6].

Цель исследования – изучение качественного и количественного состава свободных и связанных аминокислот сбора ноотропного действия.

Материал и методы

Объектом исследований служил воздушно-сухой измельченный сбор ноотропного действия, компоненты которого были заготовлены в различных областях РФ в 2018–2019 гг.

Точную навеску (5,0 г) измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, заливали 50 мл дистиллированной воды и нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Извлечение фильтровали, сырье заливали новым объемом воды (50 мл) и повторяли экстракцию еще 2 раза. Водные извлечения, полученные после трехкратной экстракции, объединяли, упаривали под вакуумом до 25 мл и проводили с ними качественный и количественный анализ [7].

При качественном анализе смешивали равные объемы исследуемых извлечений из сбора и отдельных его компонентов и 0,1% свежеприготовленного раствора нингидрина, затем осторожно нагревали до появления устойчивого красно-фиолетового окрашивания. При проведении хроматографического анализа на пластинки «Сорбфил» наносили по 5 мкл полученных извлечений и хроматографировали в системе растворителей «96% спирт этиловый : концентрированный аммиак» в соотношении 16:4,5) Хроматограммы высушивали на воздухе, обрабатывали 0,2% спиртовым раствором нингидрина и нагревали в сушильном шкафу при температуре 100–105°С в течение нескольких минут. Аминокислоты проявлялись в виде красно-фиолетовых зон адсорбции [8].

Таблица 1

Соотношение растворителей при градиентном элюировании

Table 1

The ratio of solvents in gradient elution

Время, мин	Буфер А, %	Буфер Б, %
0	97	3
16	96	4
25	90	10
35	80	20
40	80	20
50	70	30
51	0	100
54	100	0
60	100	0

Таблица 2

Состав и содержание аминокислот в ноотропном сборе, %

Table 2

The composition and content of amino acids in the nootropic herbal tea, %

№	Аминокислота	Содержание аминокислот	
		свободных	связанных
1	Аспарагиновая кислота	0,014	0,031
2	Серин	0,071	0,751
3	Глутаминовая кислота	0,008	0,022
4	Глицин	0,042	0,092
5	Гистидин	0,007	0,039
6	Аргинин	0,003	0,025
7	Треонин*	0,001	0,152
8	Аланин	0,009	0,064
9	Пролин	0,502	0,045
10	Тирозин	–	0,003
11	Валин*	0,017	0,787
12	Метионин*	0,060	0,224
13	Лизин*	0,027	0,062
14	Изолейцин*	0,290	0,676
15	Лейцин*	0,086	0,194
16	Фенилаланин*	0,027	0,049
Суммарное содержание аминокислот, %		1,165	3,216
Суммарное содержание незаменимых аминокислот,%		0,507	2,144

Примечание: * – незаменимая аминокислота.
Note: * essential amino acid.

Для более детального и количественного изучения аминокислотного состава ноотропного сбора проводили предколоночную дериватизацию и разделение аминокислот методом обращенно-фазовой хроматографии с применением флюорометрического детектора по методике WatersAccQTag. Для определения свободных аминокислот водное извлечение сбора и водные стандартные растворы аминокислот подвергали дериватизации реагентом ACCQ FLUOR. Затем перемешивали на вихревом миксере и инкубировали 10 мин при температуре 55°С. Готовые дериватизированные растворы вводили в хроматографическую систему.

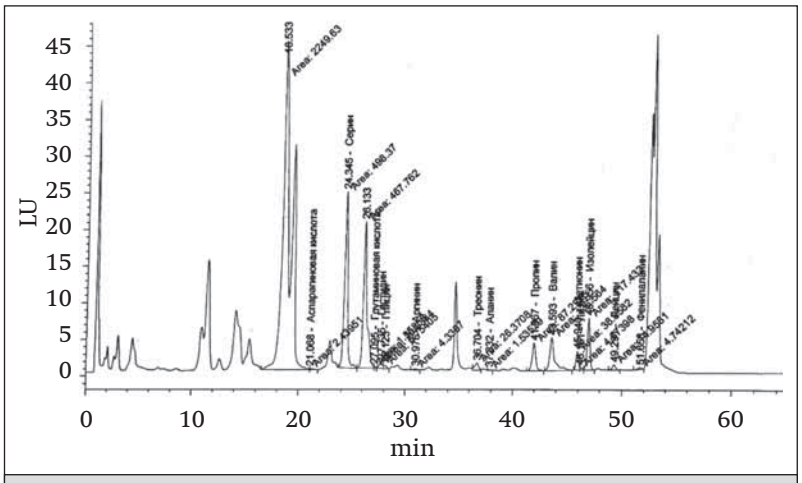


Рис. 1. Хроматограмма аминокислот ноотропного сбора
Fig. 1. Chromatogram of amino acids in the nootropic herbal tea

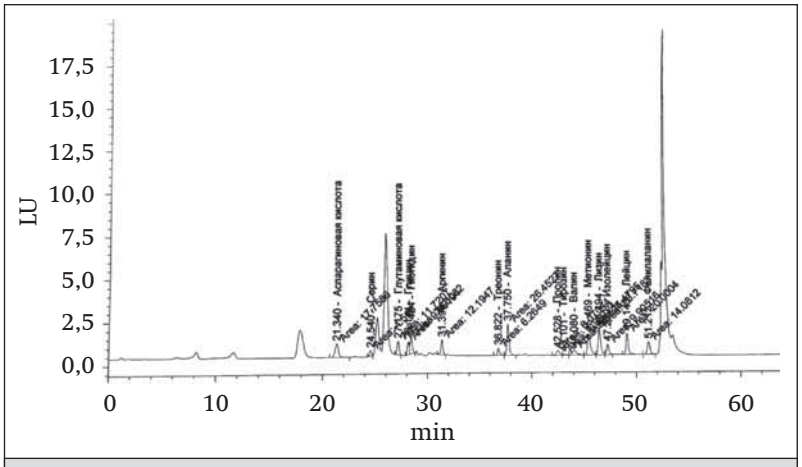


Рис. 2. Хроматограмма стандартных образцов аминокислот
Fig. 2. Chromatogram of standard samples of amino acids

Для определения связанных аминокислот водное извлечение подвергли гидролизу. Для этого образца выпаривали в чашке досуха, затем к сухому остатку добавляли 200 мкл 6М хлористоводородной кислоты и выдерживали пробу в термостате при температуре 105°С в течение 24 ч. К полученному остатку прибавляли 20 мл воды, снова выпаривали и добавляли 10 мл буферного раствора с pH 2,2. Полученные образцы подвергали дериватизации описанным способом.

Условия хроматографирования: колонка Acc Q Tag 150 × 3,9 мм; температура колонки – 37°С; скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин; время цикла – 60 мин; детектор флюоресцентный (длина волны возбуждения – 250 нм, длина волны эмиссии – 395 нм); объем пробы – 10 мкл; метод элюирования – градиентный. В качестве подвижных фаз были использованы Буфер А – натрия ацетат, триэтиламин, раствор ЭДТА, вода очищенная, Буфер Б – ацетонитрил – вода. (табл. 1).

Результаты и обсуждение

В процессе исследования в сборе ноотропного действия было установлено наличие аминокислот по реакции с нингидрином (красно-фиолетовое окрашивание раствора). При ТСХ-анализе было обнаружено 5 зон адсорбции красно-фиолетового цвета с значениями Rf 0,41; 0,52; 0,65; 0,73 и 0,84.

В результате детального анализа аминокислот было установлено, что в сборе присутствует 16 аминокислот, из них 7 незаменимых. Тирозин присутствует только в связанном виде, а остальные 15 аминокислот – как в свободном, так и в связанном виде (табл. 2; рис. 1, 2). Суммарное содержание свободных аминокислот составило 1,165%, среди которых почти половину (0,507%) составляют незаменимые аминокислоты. Преобладающими аминокислотами являются пролин и незаменимая аминокислота изолейцин – соответственно 43 и 25% от общего содержания свободных аминокислот.

Количество связанных аминокислот составило 3,216%, из которых незаменимых 2,144%, что составляет почти ⅔ от общего количества. Почти 70% связанных аминокислот представлены серином, валином и изолейцином и находятся в сборе примерно в одинаковом количестве.

Заключение

Изучен аминокислотный состав нового разрабатываемого сбора ноотропного действия. В ходе эксперимента обнаружено 16 аминокислот как в свободном, так и в связанном состоянии. Из них 7 являются незаменимыми (треонин, валин, метионин, лизин, изолейцин, лейцин, фенилаланин).

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Всемирная организация здравоохранения, [Электронное издание]. Режим доступа: ***https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death***

2. Чистякова А.С., Гудкова А.А., Сорокина А.А., Сливкин А.И. Сравнительное изучение аминокислотного состава представителей рядов ***Persicariaeformes*** Kom.и ***Lapathiiformes*** Worosch. Химия растительного сырья. 2019; 4: 157–162. DOI: 10.14258/jcprm.2019044347

3. Жумагулова К.В. и др. Опыт применения незаменимых аминокислот в комплексной терапии пациентов с ишемическим инсультов в остром периоде. Международный неврологический журнал. 2016; 5 (83): 88–90. DOI: 10.22141/2224-0713.5.83.2016.78476

4. Левченкова О.С., Новиков В.Е. Антигипоксанты: возможные механизмы действия и клиническое применение. Вестник Смоленской государственной медицинской академии, 2011; 4: 43–57.

5. Дайронас Ж.В., Корочинский А.В., Зилфикаров И.Н., Микроскопия диагностических элементов листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного в таблетках «Гинкготропил». Фармация и фармакология. 2016; 4, 1 (14): 36–45. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-1(14)-36-45

6. Лысиков Ю.А. Аминокислоты в питании человека. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2012, лекции, 86–105.

7. Бубенчикова В.Н., Степнова И.В. Изучение азотсодержащих соединений горлюхи ястребинковой (***Picris hieracioides*** L.). Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2016; 11: 1133–5.

8. Бубенчиков Р.А. Аминокислотный и минеральный состав травы фиалки удивительной ***Viola mirabilis*** L. Вестник Воронежского государственного университета. Серия Химия. Биология. Фармация. 2006; 1: 186–8.

References

1. The World Health Organization [Electronic resource]. Access mode: ***https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death*** (in Russian)

2. Chistyakova A.C., Gudkova A.A., Sorokina A.A., Slivkin A.I. Comparative study of amino acid composition of representatives of series ***Persicariaformes*** Kom. and ***Lapathiiformes*** Worosch. Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya, 2019; 4: 157–62. DOI: 10.14258/jcprm.2019044347 (in Russian)

3. Zhumahulova K.H. et al. The experience in the use of the essential amino acids for the combination treatment of patient with ischemic stroke in the acute period. Mezhdunarodnyy nevrologicheskiy zhurnal, 2016; 5 (83): 88–90. DOI: 10.22141/2224-0713.5.83.2016.78476 (in Russian)

4. Levchenkova O.S., Novikov V.E. Antihypoxants: possible mechanisms of action and their clinical uses? Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii. 2011; 4: 43–57 (in Russian)

5. Daironas J.V., Korochinsky A.V., Zilfikarov I.N. Microscopical diagnostic elements of leaves of ***Ginkgo biloba*** L. and herbs of a ***Filipendula ulmaria*** (L.) Maxim. in the tablets «Ginkgotropil». Farmatsiya i farmakologiya. 2016; 4, 1 (14): 36–45. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-1(14)-36–45. (in Russian)

6. Lysikov Yu.A. Amino acids in human nutrition. Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya. 2012, Lektsii, 86–105. (in Russian)

7. Bubenchicova V.N., Stepnova I.V. Investigation of nitrogen-containing compounds of ***Picris hieracioides*** L. Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy. 2016; 11: 1133–5 (in Russian)

8. Bubenchikov R.A., The amino acid and mineral composition of Viola mirabilis L. Vestnik VGU. Seriya Khimiya. Biologiya. Farmatsiya. 2006; 1: 186–8 (in Russian)

Поступила *28 октября 2019 г.*
Received *28 October 2019*

Принята к публикации *15 января 2020 г.*
Accepted *15 January 2020*

https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-04

© Коллектив авторов, 2020
УДК 615.2/.3.033.1.074

Опыт разработки биоаналитических методик методом ВЭЖХ с УФ-детектированием

В.М. Косман, М.В. Карлина, М.Н. Макарова

ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»,

188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмолово, Заводская ул., д. 3/245

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Косман Вера Михайловна – руководитель группы химико-аналитических исследований старший научный сотрудник, ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (812) 603-74-28, +7 (921) 740-49-24. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru, info@doclinika.ru. *ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9690-1935*

Карлина Марина Валерьевна – руководитель группы фармакокинетики, старший научный сотрудник, ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (812) 603-74-28, +7 (921) 394-33-10. E-mail: karlina.mv@doclinika.ru, info@doclinika.ru. *ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6292-8934*

Макарова Марина Николаевна – заместитель генерального директора, ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», доктор медицинских наук. Тел.: +7 (812) 603-74-28, +7 (911) 270-27-51. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru, info@doclinika.ru. *ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3176-6386*

РЕЗЮМЕ

Введение. Одним из наиболее часто применяемых в настоящее время методов для количественного анализа лекарственных веществ в биопробах, полученных при изучении фармакокинетики, биоэквивалентности или лекарственного мониторинга, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием. Он отличается гибкостью, позволяющей создавать множество методик с различными вариантами условий хроматографического разделения, детектирования, процедуры подготовки проб и др., ориентированных на конкретные целевые аналиты, учитывающие их свойства и особенности. Вместе с тем по мере накопления опыта и обобщения данных формируются те или иные закономерности, выявляются наиболее часто встречающиеся, удобные вариации, приемы или их сочетания.

Материал и методы. Представлен обзор экспериментального опыта по разработке биоаналитических методик с применением метода ВЭЖХ с УФ-детектированием для количественного анализа лекарственных веществ природного и синтетического происхождения в биопробах, полученных при изучении фармакокинетики и биоэквивалентности. Представленные материалы объединяют как методики, разработанные для фармакокинетических исследований, проводимых с использованием лабораторных животных (крыс, кроликов), так и для исследований по биоэквивалентности, выполняемых с участием здоровых добровольцев.

Результаты и обсуждение. Отмечено, что практически во всех случаях анализ выполнен в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ на аналитических колонках типа С18. В большинстве случаев (68%) подобраны изократические режимы элюирования со временем удерживания целевого аналита в диапазоне 4–8 мин; в 63% случаев в качестве элюента выбраны смеси водного раствора трифторуксусной кислоты и ацетонитрила в различных соотношениях.

Выделено три области УФ-спектра, наиболее часто используемые для детектирования – 205–220 нм (25% случаев), 220–254 нм (31%) и 270–295 нм (35%), в 9% случаев используются другие длины волн, что характеризует общие особенности спектров поглощения органических соединений.

Для подготовки биопроб плазмы крови перед дозированием в ВЭЖХ систему использованы экстракционная (36% случаев) и осадительная пробоподготовки (64% случаев). Наиболее употребительным оказалось осаждение белков плазмы ацетонитрилом (64%); метанол (15,5%) и кислотные или иные осадители (20,5%) оказались оптимальны примерно в одинаковом числе случаев.

По результатам валидационных испытаний установлено, что для большинства методик нижний предел количественного определения находится в диапазоне около 0,01–0,1 мкг/мл, что согласуется с литературными данными (0,05–0,1 мкг/мл).

Ключевые слова: биопробы, хроматографический режим, длина волны детектирования, пробоподготовка, осадительный реагент

Для цитирования: Косман В.М., Карлина М.В., Макарова М.Н. Опыт разработки биоаналитических методик методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Фармация, 2020; 69 (3): 23–35. *https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-04*

EXPERIENCE IN DEVELOPMENT OF BIOANALYTICAL METHODS BY HPLC WITH UV DETECTION

V.M. Kosman, M.V. Karlina, M N. Makarova

St.-Petersburg Institute of Pharmacy, 188663, Russian Federation, Leningrad region, Vsevolozhski municipal district, Kuzmolovo, Zavodskaya str., build. 3/245, tel/fax (812) 6037428, e-mail: info@doclinika.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Kosman Vera M., head of chemical-analytical research group, senior researcher, St.-Petersburg Institute of Pharmacy, PhD in Pharmacy. Tel.: 812-603-74-28, +7-921-740-49-24. E-mail: kosman.vm@doclinika.ru, info@doclinika.ru. ***ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9690-1935***

Karlina Marina V., head of pharmacokinetics group, senior researcher, St.-Petersburg Institute of Pharmacy, PhD in Pharmacy. Tel.: 812-603-74-28, +7-921-394-33-10. E-mail: karlina.mv@doclinika.ru, info@doclinika.ru. ***ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6292-8934***

Makarova Marina N. – depute of general director, St.-Petersburg Institute of Pharmacy, Doctor pf Medicine. Tel.: 812-603-74-28, +7-911-270-27-51. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru, info@doclinika.ru. ***ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3176-6386***

SUMMARY

Introduction. The HPLC method with UV-detection is one of most often used modern method for the quantitative analysis of drugs in biosamples obtained during pharmacokinetics, bioequivalence or drug monitoring studies. This method may be characterized by flexibility, allowing to create many assays with different variants of chromatographic separation conditions, detection, sample handling procedures, etc., oriented to specific target analytes, taking into account their properties and peculiarities. However, as experience is gained and data are compiled, patterns are formed, and the most common, convenient variations, techniques, or combinations may be identified.

Material and methods. An overview of experimental experience in the development of bioanalytical methods using HPLC-UV method for quantitative analysis of natural and synthetic drugs in biosamples obtained after pharmacokinetics and bioequivalence studies is presented.

Results and discussion. Analysis was performed in reverse phase HPLC on analytical C18 type columns in almost cases. Isocratic elution regimes were selected in most cases (68%), retention times of the target analytes were the range of 4–8 minutes. In 63% of cases mixtures of aqueous solution of trifluoroacetic acid and acetonitrile in different ratios were selected as eluent. Methods developed for pharmacokinetic studies with laboratory animals (rats, rabbits) and for bioequivalence studies done with the participation of healthy volunteers are combined in the presented materials.

Three regions of the UV spectrum were selected as most commonly used for detection – 205–220 nm (25%), 220–254 nm (31%), 270–295 nm (35%), and 9% of other wavelengths. These results characterizes general features of absorption spectra of organic compounds.

Extraction (in 36% of cases) and precipitation (in 64% of cases) were used for sample handling prior to dosing in HPLC. Precipitation of plasma proteins with acetonitrile (64%) proved to be most common; methanol (15.5%) and acidic or other precipitating agents (20.5%) were optimal in about the same number of cases.

The lower quantification limit founded from validation tests for most techniques was in the range of about 0.01–0.1 μg/ml, consistent with literature (0.05–0.1 μg/ml).

Key words: biosamples, chromatographic regime, detection wavelength, sample handling, precipitation agent

For reference: Kosman V.M., Karlina M.V., Makarova M.N. Experience in developing bioanalytical methods by HPLC with UV detection. Farmatsiya, 2020; 69 (3): 23–35. ***https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-04***

Введение

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием является удобным, эффективным и достаточно экспрессным методом количественного анализа лекарственных веществ в биопробах, полученных при изучении фармакокинетики, биоэквивалентности или лекарственного мониторинга [1–4]. По данным диссертационного исследования Д.В. Ярошенко («Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии». Дисс. … канд. хим. наук. СПб: 2014) в последние 10 лет метод ВЭЖХ используют в 48%, а ВЭЖХ-УФ – в 21% исследований, посвященных определению лекарственных веществ в плазме крови.

Метод ВЭЖХ-УФ является гибким и многообразным, позволяя создать множество методик с различными вариантами условий хроматографического разделения, детектирования, процедуры подготовки проб и т.п., ориентированных на конкретные целевые аналиты, учитывающие их свойства и особенности. Вместе с тем по мере накопления опыта формируются те или иные закономерности, выявляются наиболее часто встречающиеся, удобные вариации, приемы или их сочетания, которые становятся общепринятой нормой, вытесняя остальные. Примером подобного процесса может являться доминирующее положение обращенно-фазного варианта ВЭЖХ на колонках с привитыми октадецильными (С18) фазами, на которых по данным [5] выполняется не менее 90% всех разделений низкомолекулярных соединений.

Данная работа посвящена систематизации и ретроспективному анализу собственного многолетнего экспериментального опыта по разработке биоаналитических методик с применением метода ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Материалы, освещенные в данной публикации, получены в ходе доклинических и клинических исследований, включавших этапы по разработке и валидации биоаналитических методик

для нескольких десятков различных лекарственных веществ природного и синтетического происхождения (>60 веществ). Результаты некоторых исследований были опубликованы нами ранее [9–15]. Представленные материалы объединяют как методики, разработанные для фармакокинетических исследований, проводимых с использованием лабораторных животных (крыс, кроликов), так и для исследований по биоэквивалентности, выполняемых с участием здоровых добровольцев. Такое объединение, на наш взгляд оправдано, поскольку с аналитической точки зрения эти два типа исследований чрезвычайно близки. Отличия заключаются в биопринадлежности плазмы крови – плазма крови крыс, кроликов для фармакокинетических исследований и плазма крови человека для исследований по биоэквивалентности, и, возможно, уровнях концентраций аналита, связанных с уровнями доз и общим объемом крови. У человека уровни концентраций, которые необходимо определять, обычно ниже, т.е. методика должна быть более чувствительной.

Материал и методы

В работе использована гепаринизированная плазма крови интактных животных (крыс и кроликов) и добровольцев, хранившаяся в замороженном виде при -20°С. Субстанции соответствующих лекарственных веществ или индивидуальные соединения природного происхождения использованы в качестве стандартных образцов для разработки и валидации методик их количественного определения в биопробах.

Анализ выполнен на хроматографах высокого давления фирмы Shimadzu (Япония) с диодноматричными детекторами и колонками Luna C18 (2) 4,6×150 мм (размер частиц сорбента 5 мкм), снабженными предколонками (3 мм) заполненными тем же сорбентом (Phenomenex, США). Элюирование проводили подвижными фазами, содержащими ацетонитрил, метанол, 0,03% раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ) и другие компоненты в различных градиентных и изократических режимах элюирования, скорость подачи элюента 0,8–1,3 мл/мин, дозируемый объем проб 20–100 мкл, детектирование – диодно-матричное сканирование в диапазоне длин волн от 200–220 до 340–400 нм, обработка хроматограмм при длинах волн специфичных для каждого конкретного аналита.

Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с помощью программного обеспечения LabSolution (Shimadzu, Япония).

Результаты и обсуждение

Биоаналитическая методика с применением метода ВЭЖХ-УФ, как любая аналитическая методика, включает два основных фрагмента – описание процедуры подготовки проб и описание условий выполнения измерений, включающее условия хроматографического анализа. Разработка методики начинается с подбора оптимальных условий хроматографического анализа на примере раствора стандартного образца (СО) определяемого соединения в подходящем сравнительно простом растворителе (вода, метанол, и др.). В нашей практике в большинстве случаев в качестве СО использованы субстанции соответствующих лекарственных веществ с известным содержанием основного компонента.

Практически для всех объектов использован один тип хроматографических колонок – Luna C18 (2) 4,6×150 мм (размер частиц сорбента 5 мкм); только для цитохрома С более подходящей оказалась колонка Jupiter Proteo с аналогичными размерами – 4,6×150 мм (размер частиц сорбента 4 мкм). Это подтверждает устоявшееся суждение о том, что фаза С18 имеет наиболее широкое применение в практике ВЭЖХ. Для колонок с внутренним диаметром 4,6 мм оптимальным считают скорость подачи элюента 1 мл/мин [5], время хроматографирования для такого типа колонок обычно от нескольких минут до нескольких десятков минут. Поскольку разрабатываемые нами методики предназначались для дальнейшего серийного анализа биопроб, хроматографический режим подбирали так, чтобы время удерживания целевого аналита находилось в интервале от 4–5 до 7–8 мин, общее время записи хроматограммы не превышало 10 мин для изократических и 15–20 мин (с учетом уравновешивания системы в начальном состоянии) для градиентных режимов. В области времен удерживания до 3–4 мин обычно наблюдали значимое влияние гидрофильных несорбируемых поглощающих в УФ-свете компонентов биологической матрицы (плазмы крови), поэтому выбор более быстрых режимов для данного типа колонок нецелесообразен. При оценке приемлемости хроматографического режима обращали внимание на асимметрию пика аналита, которая в большинстве случаев не превышала 2–2,5. Длину волны детектирования стремились выбирать в максимуме поглощения целевого аналита в более специфичной области спектра; при наличии нескольких максимумов оценивали их интенсивность и выбирали оптимум между более ин-

тенсивной, но более ближневолновой областью, или менее интенсивной, но более специфичной и дальневолновой областью. Второй случай предпочтительнее, так как меньше влияние эндогенных компонентов матрицы, поглощающих в ближней УФ-области спектра. Однако следует принимать во внимание, что снижается также и чувствительность методики из-за снижения интенсивности поглощения целевого аналита. При отсутствии специфических максимумов выбирали длину волны детектирования в ближневолновой области спектра. Использование элюентов на основе ацетонитрила, с минимальным содержанием солей в водной составляющей в таком случае предпочтительнее, так как позволяет работать в области <220 нм.

В табл. 1 представлен обзор хроматографических условий, признанных по результатам экспериментальной работы оптимальными для исследованных веществ. Аналиты приведены в алфавитном порядке по международным непатентованным названиям (МНН), где это применимо.

Таблица 1

Обзор ВЭЖХ-условий для анализа ряда лекарственных препаратов в биопробах

Table 1

Review of HPLC conditions for the analysis of a number of drugs in biosamples

№ п/п	Аналит, химическое название	Режим	Элюент, соотношение (об/об)	Длина волны, нм
1.	Абакавир, (1S,4R)-4-[2-амино-6-(циклопропиламино)-9Н-пурин-9-ил]-2-циклопентен-1-метанол	Изократический	0,03% раствор ТФУ : ацетонитрил, 88:12	295
2.	Амлодипин, 2-[(2-Аминоэтокси)метил]-4-(2-хлорфенил)-1,4-дигидро-6-метил-3,5-пиридин дикарбоновой кислоты 3-этил 5-метиловый эфир	Градиентный	0,2% раствор триэтиламина, доведенный до pH 2,5 50% раствором фосфорной кислоты, : ацетонитрил	235
3.	Аторвастатин, [R(R*R*)]-2-(4-фторфенил)-β, δ-дигидрокси-(1-метилэтил)-3-фенил-4-[(фениламино) карбонил]-пиррол-1-гептановая кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ : ацетонитрил, 30:70	245
4.	Ацикловир, 2-амино-9-((2-гидроксиэтокси)метил)-1Н-пурин-6(9Н)-он	Изократический	Буферный раствор, содержащий 1,5% уксусной кислоты и 0,5% триэтиламин, : метанол, 98:2	250
5.	Бетулин, пентациклический тритерпеновый спирт ряда лупана	Изократический	Ацетонитрил	202
6.	Бикалутамид, (±)-4'-Циано-α,α,α-трифтор-3-[(п-фторфенил)сульфонил]-2-метил-м-лактотолуидид	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 50:50	270
7.	Бисопролол, 1-[4-[[2-(1-Метилэтокси)этокси]метил] фенокси]-3-[(1-метилэтил)амино]-2-пропанол	Изократический	0,5% раствор уксусной кислоты и 0,15% раствор триэтиламина : ацетонитрил, 75:25	225
8.	Бортезомиб, [(1R)-3-Метил-1-[[(2S)-1-оксо-3-фенил-2-[(пиразинилкарбонил)амино]пропил]амино]бутил] бороновая кислота	Градиентный	0,1% раствор фосфорной кислоты, доведенный до pH 6,0 триэтиламином, : ацетонитрил	270
9.	Босвелловые кислоты – босвелловая кислота (БК), ацетилбосвелловая кислота (АБК), кетобовелловая кислота (КБК), ацетилкетобосвелловая кислота (АКБК), компоненты экстракта босвеллии (*Boswellia serrata* Roxb.)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	210 и 254
10.	Букридон, букридона гидрохлорид	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	250
11.	Венлафаксин, (1-[2-(Диметиламино)-1-(4-метоксифенил)этил]циклогексанол) и о-десметилвенлафаксин	Градиентный	0,2% раствор ТФУ: ацетонитрил	225
12.	Витамин Е (токоферола ацетат), 6-ацетокси-2-метил-2-(4,8,12-триметилтридецил)-хроман	Изократический	Метанол	284
13.	Гиосцина бутилбромид, [7(S)-(1α,2β,4β,5α,7β)]-9-Бутил-7-(3-гидрокси-1-оксо-2-фенилпропокси)-9-метил-3-окса-9-азония трицикло [3.3.1.02,4]нонана бромид	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	210
14.	Гопантеновая кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 90:10	205

Продолжение табл. 1
Continuing of table 1

№ п/п	Аналит, химическое название	Режим	Элюент, соотношение (об/об)	Длина волны, нм
15.	Дарунавир, [(1S,2R) – 3-[[(4-аминофенил)-сульфонил](2-метилпропил)-амино] – 2 – гидрокси – 1 – пропил-(фенилметил)]-карбамоиновая кислота (3R, 3aS, 6aR)-эстер фуран-3-ул гексагидрофуро-[2,3-b]	Изократический	0,1 М раствор муравьиной кислоты: ацетонитрил, 50:50	265
16.	Дигидрокверцетин, 3,3',4',5,7–пентагидроксифлаванон	Градиентный	0,03% раствор ТФУ:ацетонитрил	290
17.	Диклофенак, 2-[(2,6-Дихлорфенил)амино]бензолуксусная кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 35:65	275
18.	Доксазозин, (1-(4-Амино-6,7-диметокси-2-хиназолинил)-4-[(2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-2-ил)карбонил]пиперазин)	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 70:30	246
19.	Доцетаксел, (2R,3S)-N-Карбокси-3-фенилизосерин-N-трет-бутил-13-5β,20-эпокси-1,2α,4,7β,10β,13α-гексагидрокситакс-11-ен-9-он-4- ацетат-2-бензоата тригидрат	Изократический	Вода очищенная: ацетонитрил, 50:50	229
20.	Дутастерид, (5a,17b)-N-{2,5-бис(трифторметил)-фенил}-3-оксо-4-азаадрост-1-ен-17-карбоксамид	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 30:70	240
21.	Зидовудин, 3'-азидо-3'-дезокситимидин	Изократический	Буферный раствор с pH 3,8 (1,9 г/л аммония уксуснокислого, доведенный до pH 3,8 ледяной уксусной кислотой): метанол, 70:30	265
22.	Ибупрофен, α-Метил-4-(2-метилпропил)-бензолуксусная кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 35:65	220
23.	Изотретиноин, 13-цис-ретиноевая кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: метанол, 10:90	356
24.	Икариин, компонент экстракта горянки (*Epimedium koreanum* L.)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	270
25.	Иматиниб, [(4-метил-1-пиперазинил)метил]-N-[4-метил-3-[[4-(3-пиридинил)-2-пиримидинил]амино]-фенил]бензамид метансульфонат	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	265
26.	Иринотекан, (+)-7-Этил-10-гидроксикамфотецин-10-[1,4'-биперидин]-1'-карбоксилат	Изократический	Буферный раствор, содержащий 0,01 моль/л ацетата аммония и 0,1% муравьиной кислоты: ацетонитрил, 75:25	220
27.	Каберголин, 1-[(6-Аллилэрголин-8β-ил)карбонил]-1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилмочевина	Изократический	Фосфатный буферный раствор с pH 2,0 (6,8 г/л калия фосфорнокислого однозамещенного доведенный до pH 2,0 50% раствором кислоты фосфорной, и содержащий 0,2 мл триэтиламина): ацетонитрил, 82:18	215
28.	Катехин, (+)-катехин, компонент экстракта лапчатки белой (*Potentilla alba* L.)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	280
29.	Кверцетин, 2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-4H-1-бензопиран-4-он	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 65:35	370
30.	Кетопрофен, 3-бензоил-α-метилбензолуксусная кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 50:50	254
31.	Клопидогрел, метил-(+)-(S)-α-(о-хлорфенил)-6,7-дигидротиено[3.2-c]пиридин-5(4H)-ацетат в организме метаболизируется до неактивного метаболита – карбоксиловой кислоты клопидогрела	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	220
32.	Ламивудин, (2R-цис)-4-Амино-1-[2-(гидроксиметил)-1,3-оксатиолан-5-ил]-2(1H)-пиримидинон	Изократический	Буферный раствор с pH 3,8 (1,9 г/л аммония уксуснокислого, доведенный до pH 3,8 ледяной уксусной кислотой): метанол, 90:10	277
33.	Леветирацетам, (-)-(s)-этокси-2-оксо-1-пирролиин ацетамид	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 10:90	205

Продолжение табл. 1
Continuing of table 1

№ п/п	Аналит, химическое название	Режим	Элюент, соотношение (об/об)	Длина волны, нм
34.	Левофлоксацин, (-)-(S)-9-Фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7Н-пиридо[1,2,3-de]1,4-бензоксазин-6-карбоновая кислота гемигидрат	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 82:18	295
35.	Лейпрорелин, 6-D-Лейцин-9-(N-этил-L-пролинамид)-10-деглицинамид-лютеинизирующий гормон-рилизинг-фактор	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	210
36.	Линезолид, N-[[(5S)-3-[3-Фтор-4-(4-морфолинил) фенил]-2-оксо-5-оксазолидинил]метил]ацетамид	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 75:25	250
37.	Лозартан, 2-Бутил-4-хлор-1-[[2'-(1Н-тетразол-5-ил) [1,1'-бифенил]-4-ил]-метил]-1Н- имидазол-5-метанол	Градиентный	Буферный раствор с pH 2,5 (0,2% раствор триэтиламина, доведенный до pH 2,5 50% раствором фосфорной кислоты): ацетонитрил	220
38.	Лютеин, 3,3'-дигидрокси-β-каротин	Изократический	Метанол : ацетонитрил 5:95	450
39.	Мелатонин, N-[2-(5-Метокси-1Н-индол-3-ил)этил] ацетамид	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 75:25	220
40.	Метокситиозинид, 1-(2-хлор-6-метоксихинолин-3-ил)-4-(диметиламино)-2-(1-нафтил)-1-фенилбутан-2-ол в виде гидрохлорида	Изократический	Буферный раствор, содержащий 0,5% ледяной уксусной кислоты и 0,15% триэтиламина: ацетонитрил, 50:50	225
41.	Миртазапин, 1,2,3,4,10,14b-Гексагидро-2-метилпиразино[2,1-a]пиридо[2,3-c][2]бензазепин	Изократический	0,03% раствор ТФУ и 0,3% триэтиламина: ацетонитрил в соотношении 35:65	295
42.	Моксифлоксацин, 1-циклопропил-6-фтор-1,4-дигидро-8-метокси-7-[(4aS,7aS)-октагидро-6Н-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил]-4-оксо-3-хинолинкарбоновая кислота (в виде гидрохлорида)	Изократический	Буферный раствор, содержащий 0,5% ледяной уксусной кислоты и 0,15% триэтиламина: ацетонитрил, 75:25	295
43.	Неларабин, (2-амино-β-D-арабинофуранозил-6-метокси-9Н-пурин) и 9-β-D-арабинофуранозилгуанин	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	280 и 254
44.	Оксалиплатин, [(1R,2R)-1,2-Циклогександиамин-N,N']][оксалато(2)-O,O']платина	Изократический	Буферный раствор, содержащий 0,5% ледяной уксусной кислоты и 0,15% триэтиламина: ацетонитрил, 97:3	220
45.	Рабепразол, 2-[[[4-(3-Метоксипропокси)-3-метил-2-пиридил]метил]сульфинил]бензимидазол	Изократический	Буферный раствор с pH 4,0 (1,9 г/л аммония уксуснокислого, доведенный до pH 4,0 ледяной уксусной кислотой): ацетонитрил, 70:30	280
46.	Ребамипид, N-(4-хлорбензоил)-3-(2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил)аланин	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 65:35	230
47.	Рибавирин, 1-β-D-рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид	Изократический	Вода очищенная	210
48.	Рисперидон, 3-[2-[4-(6-Фтор-1,2-бензизоксазол-3-ил) пиперидино]этил]-6,7,8,9-тетрагидро-2-метил-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он	Градиентный	Буферный раствор с pH 6,5 (154 г/л аммония ацетата, доведенный до pH 6,5 ледяной уксусной кислотой): ацетонитрил	275
49.	Рифабутин, (9S,12E,14S,15R,16S,17R,18R,19R,20S,21S,22E,24Z)-6,18,20-тригидрокси-14-метокси-7,9,15,17,19,21,25-гептаметил-1'-(2-метилпропил)-5,10-26-триоксо-3,5,9,10-тетрагидроспиро[9,4-(эпоксипентадека[1,11,13]триенимино)-2Н-фуро[2',3',7,8]нафто[1,2d]имидазол-2,4'-пиперидин]-16-ил-ацетат	Изократический	Буферный раствор с pH 4,0 (3,8 г/л аммония уксуснокислого, доведенный до pH 4,0 ледяной уксусной кислотой): ацетонитрил, 50:50	275
50.	Силденафил, 1-[[3-(6,7-Дигидро-1-метил-7-оксо-3-пропил-1Н-пиразоло[4,3-α]пиримидин-5-ил)-4-этоксифенил] сульфонил]пиперазина цитрат	Изократический	Буферный раствор с pH 5,5 (0,2% раствор фосфорной кислоты, доведенный до pH 5,5 40% раствором гидроксида натрия): ацетонитрил, 55:45	225
51.	Схизандрин (схизандрол А), компонент экстракта лимонника китайского (*Schisandra chinensis* L.)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	250

Продолжение табл. 1
Continuing of table 1

№ п/п	Аналит, химическое название	Режим	Элюент, соотношение (об/об)	Длина волны, нм
52.	Такролимус, (3S,4R,5S,8R,9E,12S,14S,15R,16S,18R,19R,26aS)-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-Гексагидро-5,19-дигидрокси-3-[(1E)-2-[(1R,3R,4R)-4-гидрокси-3-метоксициклогексил]-1-метилэтенил]-14,16-диметокси-4,10,12,18-тетраметил-8-(2-пропенил)-15,19-эпокси-3Н-пиридо[2,1-с][1,4]-оксааза-циклотрикозин-1,7,20,21(4Н,23Н)-тетрон (в виде моногидрата)	Изократический	Ацетонитрил	215
53.	Теризидон, 1,4-бис-D(3-оксо-4 изоксазолидинилиминометил)-бензол	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 30:70	240
54.	Тилорон, 2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9Н-флуорен-9-он (и в виде дигидрохлорида)	Градиентный	Буферный раствор, содержащий 0,5% уксусной кислоты и 0,15% триэтиламина: ацетонитрил	270
55.	Торасемид, 1-(1-метилэтил)-3-[[4-[(3-метилфенил)-амино]-пиридин-3-ил] сульфонил]-мочевина	Изократический	Буферный раствор с pH 4,0 (1,9 г/л аммония уксуснокислого, доведенный до pH 4,0 ледяной уксусной кислотой): ацетонитрил, 70:30	290
56.	Трипептид (лизил-глутамил-триптофан)	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	220
57.	Убидекаренон, 2,3-диметокси-5-метил-6-декапренил-1,4-бензохинон	Изократический	Гексан: метанол 2:8	275
58.	Фелодипин, 4-(2,3-Дихлорфенил)-1,4-дигидро-2,6-диметил-3,5-пиридиндикарбоновой кислоты этилметиловый эфир	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 70:30	360
59.	Хлорогеновая кислота, соединение группы коричных кислот, компонент экстракта кофейного дерева *Frangula california* (Eschsch.) Gray *(California coffeberry)*	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	325
60.	Циклосерин, (R)-4-амино-3-изоксазолидинон	Изократический	Буферный раствор с pH 4,4 (0,75 г/л додекансульфоната натрия, содержащий 3,15 мл/л ледяной уксусной кислоты, доведенный до pH 4,4 0,5 Н раствором гидроксида натрия): ацетонитрил, 90:10	225
61.	Цитохром С (колонка Юпитер протео), фермент, гемопротеин с молекулярной массой около 14 кДа	Градиентный	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил	395
62.	Ципрофлоксацин, 1-циклопропил-6-фтор-1,4-дигидро-4-оксо-7-(1-пиперазинил)-3-хинолинкарбоновая кислота	Изократический	0,03% раствор ТФУ: ацетонитрил, 82:18	280
63.	Эфавиренз, (4S)-6-Хлор-4-(циклопропилэтинил)-1,4-дигидро-4-(трифтор-метил)-2Н-3,1-бензоксазин-2-он	Изократический	0,1 М раствор муравьиной кислоты: ацетонитрил, 30:70	245

На основании представленных данных (см. табл. 1) в 68% случаев (для 43 веществ) были подобраны изократические режимы, причем в значительном числе случаев (около 47% от числа изократических режимов или около 32% от общего числа) элюентом являлась смесь 0,03% раствора ТФУ и ацетонитрила. В 32% случаев (20 веществ) были выбраны различные градиентные режимы; смесь 0,03% раствора ТФУ и ацетонитрила также была превалирующей (75% случаев от числа градиентных режимов или около 24% от общего числа). В целом различные сочетания раствора ТФУ и ацетонитрила оказались оптимальными для 40 из 63 веществ (около 63%). Преимуществами этого элюента является его простота, доступность, отсутствие негативного влияния на компоненты хроматографической системы – колонку, клапана насосов и других элементов, присущих, например, солесодержащем буферным растворам [16]. Кислые элюенты (pH 0,03% раствора ТФУ около 2,3) чаще оказываются более предпочтительными в ВЭЖХ, позволяя сместить pH элюента от области pKa анализируемых соединений и перевести ионогенные аналиты в протонированную форму (Н-форму) [5]. Современные хроматографические колонки

более устойчивы в области кислых значений pH, чем щелочных – например, используемый тип колонок Luna C18 (2) рекомендован для работы с элюентами в диапазоне pH 1,5–10 [17]. Кроме того, ТФУ является одним из ион-парных реагентов, улучшающих удерживание и хроматографический анализ ряда ионогоенных, гидрофильных соединений [5].

Доминирование изократических режимов над градиентыми также вполне объяснимо. Изократические режимы в целом более устойчивы, стабильны, экономичны по времени (не требуется затрат времени на возвращение и уравновешивание системы в исходное состояние). Кроме того, большинство задач нацелено на анализ одного целевого компонента, поэтому довольно легко удается подобрать изократический режим, позволяющий элюировать мешающие компоненты матрицы в начале хроматограммы, а целевой аналит – в области оптимальных времен удерживания (4–8 мин). Градиентные режимы потребовались для задач, предусматривающих анализ двух и более аналитов (венлафаксин и о-десметилвенлафаксин; неларабин и 9-β-D-арабинофуранозилгуанин босвелловые кислоты), компонентов растительных экстрактов (например, икариин, катехин, схизандрин, хлорогеновая кислота) или сравнительно гидрофильных объектов со сложной структурой, способных к образованию водородных связей и т.п., элюирующихся в изократических режимах в виде несимметричных, размытых пиков (с фактором асимметрии >2,5). Для таких аналитов рационально введение ион-парных реагентов (ТФУ, триэтиламина, октансульфоновой кислоты и др.) в состав элюента. В ряде случаев оказывается достаточным наиболее простого из таких реагентов – ТФУ в сочетании с градиентным режимом со сравнительно быстрой скоростью изменения концентрации ацетонитрила (2–4,5% в минуту).

При работе с элюентами, состоящим из 0,03% раствора ТФУ и ацетонитрила, большинство использованных нами градиентных режимов включали линейное изменение содержания ацетонитрила в составе элюента от 10–20 до 50–60% за 10–15 мин. Среди изократических режимов можно выделить две группы, условно названные гидрофильными – с содержанием ацетонитрила 10–30% (10 веществ, 16% от общего числа аналитов), и гидрофобными – с содержанием ацетонитрила 50–100% (11 веществ, около 18% от общего числа аналитов).

Анализируя сведения о длинах волн детектирования, можно выделить три области УФ-спектра, используемые наиболее часто – 205–220 нм (16 веществ, около 25%), 220–254 нм (20 веществ, около 31%), 270–295 нм (23 вещества, 35%) и более 300 нм (6 веществ, 9%) (рис. 1). Выбор длин волн в более длинноволновой области (350–370 нм) является скорее исключением, обусловленным наличием у аналитов специфических максимумов поглощения в этой области (6 веществ, около 9%). В первой области наиболее часто используемой оказалась длина волны 220 нм (8 веществ), во второй и третьей областях явного лидера не выявлено. Отметим, что в третьей области одинаковое число раз (по 4 раза) выбрано несколько близких длин волн – 270, 275, 280 и 295 нм. Видимо, такая ситуация характеризует общие особенности спектров поглощения органических соединений – в большинстве случаев основные максимумы располагаются в области 220–300 нм.

Следующим этапом разработки аналитической методики после выбора оптимальных условий хроматографирования и регистрации аналитического отклика является выбор оптимального способа подготовки проб. Для биоаналитических исследований этот этап является ключевым, поскольку биопробы являются сложными комплексными матрицами. Перед их введением в ВЭЖХ-системы необходима специальная подготовка образцов, позволяющая максимально удалить компоненты, мешающие определению, и выделить целевой аналит [1, 18].

В табл. 2 и на рис. 2 представлены сведения о процедурах подготовки проб, выбранных для исследованных веществ (аналиты приведены в алфавитном порядке).

В нашей практике использованы два основных типа подготовки проб – осадительная и экстракционная (см. рис. 2).

Экстракционная пробоподготовка выбрана в 36% случаев (для 22 веществ). При этом в 2 случаях (около 9% от числа экстракционных пробоподготовок и около 3,5% от общего числа) pH среды был в кислой области (pH<7); в 7 случаях (около 32% от числа экстракционных пробоподготовок и около 11,5% от общего числа) было выбрано pH среды в щелочной области (pH>7) и в 13 случаях (около 59% от числа экстракционных пробоподготовок и 21% от общего числа) введения ионогенных добавок не потребовалось (pH≈7). Поскольку реализация этого типа пробоподготовки предусматривает довольно трудоемкий и длительный подбор

Таблица 2

Обзор вариантов пробоподготовки для анализа различных лекарственных препаратов в биопробах (плазма крови)

Table 2

Review of the variants of sample preparation for the analysis of various drugs in biosamples (plasma)

№ п/п	Аналит	Видопринадлежность биологической матрицы (плазмы крови)	Тип пробоподготовки	Реагенты	Соотношение проба: реагент (об/об)	Замена растворителя (±), растворитель конечной пробы
1.	Абакавир	Кролик	Экстракционная	0,5 Н раствор калия гидроксида, затем этилацетат: дихлорметан, 9:1	1:0,5 1:5	+, вода
2.	Амлодипин	Кролик	Экстракционная	Смесь диэтиловый эфир:дихлорметан 7:3	1:7,5	+, метанол
3.	Аторвастатин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	–
4.	Ацикловир	Человек	Осадительная	1% раствор хлорной кислоты	1:0,2	–
5.	Бикалутамид	Человек	Экстракционная	Хлористый метилен : диэтиловый эфир, 7:3	1:10	+, метанол
6.	Бетулин	Крыса	Экстракционная	Ацетон, затем хлороформ	1:2 1:6	+, метанол
7.	Бисопролол	Кролик, человек	Экстракционная	0,1 Н раствор натрия гидроксида, затем хлороформ	1:0,75 1:3	+, 0,03% раствор ТФУ
8.	Бортезомиб	Кролик	Осадительная	0,1% раствор муравьиной кислоты	1:3	+, метанол
9.	Босвелловые кислоты	Крыса	Экстракционная	Ацетон, затем хлороформ	1:1,5 1:2	+, метанол
10.	Букридон	Кролик, крыса	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
11.	Венлафаксин и о-десметилвенлафаксин	Человек	Экстракционная	2 Н раствор натрия гидроксида, затем этилацетат	1:0,25 1:6	+, 0,03% раствор ТФУ
12.	Витамин Е (токоферола ацетат)	Кролик	Экстракционная	Этанол, затем гексан	1:5 1:10	+, метанол
13.	Гиосцин	Крыса	Осадительная	Метанол	1:2	+, 0,03% раствор ТФУ
14.	Гопантеновая кислота	Человек	Осадительная	Метанол	1:3	+, 0,2% раствор соляной кислоты
15.	Дарунавир	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
16.	Дигидрокверцетин	Кролик	Экстракционная	Ферментативный гидролиз, затем этилацетат	1:3	+, этанол
17.	Диклофенак	Крыса	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
18.	Доксазозина мезилат (артезин)	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
19.	Доцетаксел	Крыса	Экстракционная	Этилацетат	1:12,5	+, метанол
20.	Дутастерид	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
21.	Зидовудин	Человек	Осадительная	Метанол	1:2	+, элюент (буферный раствор с pH 3,8 : метанол, 70:30)
22.	Ибупрофен	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
23.	Изотретиноин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
24.	Иматиниб	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
25.	Иринотекан	Крыса	Осадительная	0,5 Н раствор хлорной кислоты	1:0,2	–

Продолжение табл. 2
Continuing of table 2

№ п/п	Аналит	Видопринадлежность биологической матрицы (плазмы крови)	Тип пробоподготовки	Реагенты	Соотношение проба: реагент (об/об)	Замена растворителя (±), растворитель конечной пробы
26.	Каберголин	Человек	Экстракционная, осадительная	Боратный буферный раствор с pH 10,0, затем этилацетат ацетонитрил	1:1 1:4 1:3	+, метанол, +, 0,1% раствор муравьиной кислоты
27.	Катехин	Крыса	Экстракционная	Этилацетат	1:3	+, 50% раствор соляной кислоты : этанол 1:1
28.	Кверцетин	Крыса	Экстракционная	Этилацетат	1:3	+, этанол
29.	Кетопрофен	Крыса	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
30.	Клопидогрел (в виде карбоксиловой кислоты клопидогрела)	Человек	Экстракционная	2Н раствор соляной кислоты, затем гексан: диэтиловый эфир, 2:8	1:0,2 1:30	+, метанол
31.	Ламивудин	Человек	Осадительная	Метанол	1:2	+, элюент (буферный раствор с pH 3,8 : метанол, 90:10)
32.	Леветирацетам	Человек	Осадительная	0,4 М раствор хлорной кислоты	1:0,1	–
33.	Левофлоксацин	Человек	Осадительная	1 Н раствор хлорной кислоты	1:0,2	–
34.	Лейпрорелин	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
35.	Линезолид	Человек	Осадительная	Метанол	1:2	+, метанол
36.	Лозартан	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
37.	Лютеин	Крыса	Экстракционная	Этанол, затем гексан	1:1 1:2	+, метанол
38.	Мелатонин	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
39.	Метокситиозонид	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
40.	Миртазапин	Человек	Экстракционная	25 % раствор аммиака, затем гексан	1:0,1 1:5	+, метанол
41.	Моксифлоксацин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
42.	Неларабин и 9-β-D-арабинофуранозилгуанин	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, вода
43.	Рабепразол	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
44.	Ребамипид	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, метанол
45.	Рибавирин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, вода
46.	Рисперидон	Человек	Экстракционная	0,1 Н раствор натрия гидроксида, 30% раствор натрия хлорида, затем диэтиловый эфир	1:0,3 1:0,4 1:6	+, элюент (буферный раствор с pH 6,5 : ацетонитрил, 70:30)
47.	Рифабутин	Крыса	Экстракционная	Элюент (ацетонитрил: буферный раствор с pH 4,0, 50:50), затем дихлорметан: изооктана, 2:3	1:0,5 1:2	+, метанол
48.	Силденафил	Человек	Экстракционная	0,5 Н раствор натрия гидроксида, затем дихлорметан	1:0,2 1:8	+, метанол
49.	Схизандрин	Крыса	Экстракционная	Диэтиловый эфир	1:3	+, метанол
50.	Трипептид (лизил-глутамил-триптофан)	Кролик	Осадительная	15% раствор хлорной кислоты	1:0,1	–

Продолжение табл. 2
Continuing of table 2

№ п/п	Аналит	Видопринадлежность биологической матрицы (плазмы крови)	Тип пробоподготовки	Реагенты	Соотношение проба: реагент (об/об)	Замена растворителя (±), растворитель конечной пробы
51.	Такролимус	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:2	+, ацетонитрил
52.	Теризидон	Человек	Осадительная	Метанол	1:2	-
53.	Тилорон	Кролик	Экстракционная	Хлороформ	1:5	+, этанол
54.	Торасемид	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
55.	Фелодипин	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил, затем 10% раствор хлорной кислоты	1:1 1:1	–
56.	Убидекаренон	Крыса	Экстракционная	Метанол, затем гексан	1:1,7 1:4	+, ацетон
57.	Хлорогеновая кислота	Крыса	Осадительная	10% раствор хлорной кислоты	1:0,5	–
58.	Циклосерин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, вода
59.	Цитохром С	Кролик	Осадительная	Ацетонитрил : 0,03% раствор ТФУ, 50:50	1:1	–
60.	Ципрофлоксацин	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, метанол
61.	Эфавиренз	Человек	Осадительная	Ацетонитрил	1:3	+, элюент (0,1 М раствор муравьиной кислоты : ацетонитрил, 30:70)

оптимальных условий экстракции (экстрагент, pH среды, соотношение двух фаз, время обработки и т.п.), мы применяли этот способ только при наличии хотя бы минимальных (экстрагент, соотношение) литературных сведений.

Экстракционную подготовку проб или жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) используют преимущественно в распределительном варианте. Этот способ предполагает извлечение аналита в слой органического растворителя (этилацетата, диэтилового эфира, хлороформа и др.) не смешивающегося с гидрофильной средой пробы с предварительным добавлением кислых или щелочных реагентов для создания оптимального значения pH или без такового [1]. Важную роль при выборе экстрагента играют химические свойства аналита, а изменение pH позволяет управлять их полярностью для повышения эффективности экстракции (кислоты имеют большее сродство к органической фазе при низких значениях pH, основания – при высоких). К недостаткам ЖЖЭ относят трудоемкость, времязатратность, многостадийность.

Осадительная пробоподготовка оказалась оптимальной в 64% случаев (39 веществ), причем лидирующее положение занимает осаждение ацетонитрилом – 64% от числа осадительных пробоподготовок или 42% от общего числа (25 веществ), метанол и кислотные или иные осадители оказались оптимальны в примерно одинаковом числе случаев – 6 (15,5% от числа осадительных пробоподготовок или 10% от общего числа) и 8 (20,5% от числа осадительных пробоподготовок или 13% от общего числа) соответственно (см. табл. 2, рис. 2). Осаждение белков является наиболее простым, универсальным и достаточно эффективным способом подготовки биопроб к ВЭЖХ-анализу [3, 19]. Этот способ позволяет удалить до 98% протеинов плазмы крови [18]. Процедура является быстрой недорогой, простой в исполнении и может быть применена для широко спектра аналитов [19]. В качестве осадителей обычно используют растворы кислот (трихлоруксусной, хлорной, муравьиной и др.), метанол, ацетонитрил, реже соли и другие реагенты. Метанол и ацетонитрил используют наиболее часто, поскольку эти растворители хорошо смешиваются с гидрофильной средой биопроб (плазмы крови), легко удаляются (процедура пробоподготовки часто предусматривает замену растворителя, необходимую для компенсации разбавления пробы осадителем), оптимальны для последующего перерастворения проб и совместимы с элюентами, используемыми в ВЭЖХ.

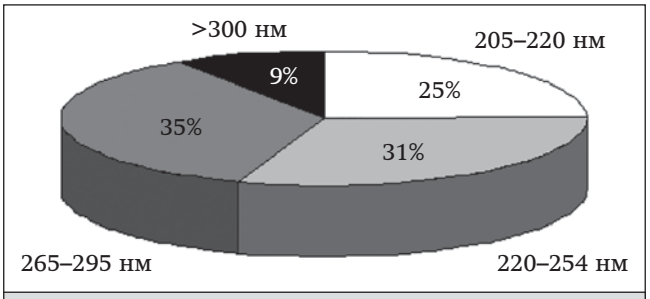


Рис. 1. Диаграмма распределения длин волн детектирования по областям УФ-спектра
Fig. 1. A distribution diagram for wavelengths of detection by the UV regions

Рис. 2. Диаграмма распределения по типам подготовки проб
Fig. 2. A distribution diagram by the types of sample preparation

Все разработанные методики были надлежащим образом валидированы в соответствии с требованиями руководств (ICH Q2A Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures; ICH Q2B Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology; Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP 192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011; Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2001). Основными валидационными параметрами методик количественного определения лекарственных веществ в плазме крови являлись селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), калибровочный диапазон, точность, прецизионность, стабильность аналита. По всем валидационным параметрам были получены результаты, удовлетворяющие предъявляемым требованиям. Концентрации, соответствующие НПКО для большинства аналитов находилось в диапазоне 0,01–0,1 мкг/мл, что согласуется с литературными данными [2, 3] и характеризует уровень чувствительности биоаналитических методик с применением метода ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Заключение

Выявленные особенности могут быть применены в дальнейшем к более широкому кругу аналитов при создании и совершенствовании биоаналитических методик с применением метода ВЭЖХ-УФ.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Медведев Ю.В., Раменская Г.В., Шохин И.Е., Ярушок Т.А. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор). Химико-фармацевтич. журнал. 2013; 47 (4): 45–51 [Medvedev YU.V., Ramenskaya G.V., Shohin I.E., Yarushok T.A. VEZHKH i SVEZHKH kak metody dlya opredeleniya lekarstvennyh veshchestv v krovi (obzor). Himiko-farmacevtich. zhurnal. = Pharmaceutical chemistry journal. 2013; 47 (4): 45–51 (in Russian)].

2. Рейхарт Д.В., Чистяков В.В. Высокочувствительные аналитические методы в оценке биоэквивалентности лекарственных препаратов (обзор). Химико-фармацевтич. журнал. 2009; 43 (12): 39–46. [Rejhart D.V., CHistyakov V.V. Vysokochuvstvitel'nye analiticheskie metody v ocenke bioekvivalentnosti lekarstvennyh preparatov (obzor). Himiko-farmacevtich. zhurnal. = Pharmaceutical chemistry journal. 2013; 2009; 43 (12): 39–46 (in Russian)].

3. Рейхарт Д.В., Чистяков В.В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях. Казанский мед. журнал. 2010; 91 (4): 532–6. [Rejhart D.V., CHistyakov V.V. Analiz lekarstvennyh sredstv pri farmakokineticheskih issledovaniyah. Kazanskij med. zhurnal. 2010; 91 (4): 532–6] (in Russian)].

4. Wada M., Alkhalil S.M., Nakashima K. Current HPLC methods for determination of medicaments in formulations and biological samples. Jordan journal of Pharmaceutical Sciences. 2008; 1 (1): 1–27.

5. HPLC for pharmaceutical scientists. Ed. by Y. Kazakevich, R. Lobrutto. N.-Y.: Willey and sons. 2007; 1135.

6. Карлина М.В., Пожарицкая О.Н., Косман В.М., Иванова С.А. Изучение биологической доступности босвеллиевых кислот: In vitro/in vivo корреляция. Химико-фармацевтич. журнал. 2007; 41 (11): 38–41. [Karlina M.V., Pozharickaya O.N., Kosman V.M., Ivanova S.A. Izuchenie biologicheskoj dostupnosti bosvellievyh kislot: In vitro/in vivo korrelyaciya. Himiko-farmacevtich. zhurnal. = Pharmaceutical chemistry journal. 2007; 41 (11): 38–41 (in Russian)].

7. Карлина М.В., Пожарицкая О.Н., Косман В.М., Шиков А.Н., Лазукина М.А., Дьячук Г.И. Исследование фармакокинетики гопантеновой кислоты при введении внутрь. Эксперим. и клин. фармакология. 2010; 73 (8): 46–8. [Karlina M.V., Pozharickaya O.N., Kosman V.M., SHikov A.N., Lazukina M.A., D'yachuk G.I. Issledovanie farmakokinetiki gopantenovoj kisloty pri vvedenii vnutr'. Eksperim. i klin. Farmakologiya. 2010; 73 (8): 46–8 (in Russian)].

8. Карлина М.В., Пожарицкая О.Н., Косман В.М., Макарова М.Н., Шиков А.Н., Макаров В.Г., Забозлаев А.А. Экспериментальная фармакокинетика препарата Валеокор-Q10. Фармация. 2012; 8: 35–7. [Karlina M.V., Pozharickaya O.N., Kosman V.M., Makarova M.N., SHikov A.N., Makarov V.G., Zabozlaev A.A. Eksperimental'naya farmakokinetika preparata Valeokor-Q10. Farmaciya. 2012; 8: 35–7 (in Russian)].

9. Карлина М.В., Косман В.М., Пожарицкая О.Н., Балабаньян В.Ю., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Экспериментальное исследование фармакокинетики рифабутина в липосомальной форме. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2013; 1 (6): 37–41. [Karlina M.V., Kosman V.M., Pozharickaya O.N., Balaban'yan V.YU., SHikov A.N., Makarov V.G. Eksperimental'noe issledovanie farmakokinetiki rifabutina v liposomal'noj forme. Farmakokinetika i farmakodinamika. 2013; 1 (6): 37–41 (in Russian)].

10. Карлина М.В., Косман В.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Фармакокинетика схизандрола А на крысах при введении масляного экстракта лимонника. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014; 1: 34–9 [Karlina M.V., Kosman V.M., Pozharickaya O.N., SHikov A.N., Makarov V.G. Farmakokinetika skhizandrola A na krysah pri vvedenii maslyanogo ekstrakta limonnika. Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv. 2014; 1: 34–9 (in Russian)].

11. Karlina M.V., Pozharitskaya O.N., Shikov A. N., Kosman V. M., Makarova M.N., Makarov V.G. LC Method for Quantification of Lutein in Rat Plasma: Validation, and Application to a Pharmacokinetic Study. Chromatographia, 2008; 68 (11–12): 949–54. DOI: 10.1556/AChrom.23.2011.3.3

12. Pozharitskaya O.N., Karlina M.V., Shikov A N., Kosman V.M., Makarova M.N., Makarov V.G. Determination of icariin in rat plasma by reverse-phase high-performance liquid chromatography after oral administration of lipid-based suspension of Epimedium koreanum extract. Biomed. Chromatogr. 2008; 22: 625–9. DOI: 10.1002/bmc.978

13. Pozharitskaya O.N., Karlina M.V., Shikov A.N., Kosman V.M., Makarova M.N., Makarov V.G. Determination and pharmacokinetic study of taxifolin in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography. Phytomedicine. 2009; 16: 244–51. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.10.002

14. Pozharitskaya O.N., Kosman V.M., Karlina M. V., Shikov A.N., Makarov V.G., Djachuk G. Method development and validation of an HPLC assay for the detection of hopantenic acid in human plasma and its application to a pharmacokinetic study on volunteers. Acta chromatographica. 2011; 23: 403–14.

15. Pozharitskaya O.N., Karlina M.V., Shikov A.N., Kosman V.M., Makarov V.G., Rosenholm J. Pharmacokinetics and Tissue Disposition of Betulin after Endotracheal Administration to Rats. Eur. J. Dru.g Metab. Pharmacokinet. 2017; 42: 327–32. DOI: 10.1007/s13318-016-0340-7

16. Садек П. Растворители для ВЭЖХ/ Пер. с англ. А.А. Горбатенко и Е.И. Ревиной. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006; 704. [Sadek P. Rastvoriteli dlya VEZHKH/ Per. s angl. A.A. Gorbatenko i E.I. Revinoj. M.: BINOM. Labora¬toriya znanij, 2006; 704 (in Russian)].

17. Chromatography product guide 2016–17. Phenomenex, USA. 2016; 408.

18. Majors R.E. Sample preparation fundamentals for chromatography. Agilent Inc: Canada, 2013; 364.

19. Alshammari T.M., Al-Hassan A.A., Hadda T.B., Aljofan M. Comprasion of different serum sample extraction metods and their suitability for mass spectrometry analysis. Saudi pharmaceutical journal. 2015; 63: 689–97.

***Поступила** 2 сентября 2019 г.*
***Received** 2 September 2019*

***Принята к публикации** 19 декабря 2019г.*
***Accepted** 19 December 2019*

https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-05

© **Коллектив авторов**, 2020

УДК 615.456:[615.375:547.962.4].07

Методические подходы к разработке и аттестации стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности

М.А. Кривых, О.Г. Корнилова, Е.А. Хуснатдинова, Н.Д. Бунятян, Ю.В. Олефир

Научный центр экспертизы средств медицинского применения

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр.2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кривых Максим Андреевич – главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (909) 915-37-64. E-mail: Krivykh@expmed.ru. *ORCID: 0000-0002-2003-1264*

Корнилова Ольга Геннадьевна – главный эксперт лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, кандидат медицинских наук. Тел.: +7 (925) 352-61-03 E-mail: Kornilova@expmed.ru. *ORCID: 0000-0003-1439-2052*

Хуснатдинова Екатерина Александровна – эксперт 1 категории лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, кандидат биологических наук. Тел.: +7 (915) 095-25-70 E-mail: Husnatdinova@expmed.ru. *ORCID: 0000-0001-8493-9688*

Бунятян Наталья Дмитриевна – заведующая кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России, главный научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (916) 797-07-72. E-mail: ndbun@mail.ru. *ORCID: 0000-0003-0936-5551*

Олефир Юрий Витальевич – генеральный директор ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, доктор медицинских наук. Тел.: +7 (495) 625-43-42. E-mail: Olefir@expmed.ru. *ORCID: 0000-0001-7652-4642*

РЕЗЮМЕ

Введение. Необходимость использования стандартизованных методик определения специфической безопасности инфузионных лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека обусловлена вариабельностью критических параметров, связанных с использованием биологических реагентов, поэтому проблемы разработки и проведения аттестационных исследований стандартных образцов приобретают особую актуальность.

Цель исследования – анализ методических подходов к разработке и аттестации стандартного образца для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека.

Материал и методы. Использовали стандартные образцы иммуноглобулина человека – зарубежный (BRP), утвержденный Европейским директоратом по качеству лекарственных средств и здравоохранения (Франция) и отечественный. Применялись методы системного анализа и документальной экспертизы. Антикомплементарную активность определяли методом, основанным на способности иммуноглобулинов человека связывать комплемент, препятствуя лизису сенсибилизированных эритроцитов барана в реакции связывания комплемента.

Результаты. Сравнительный анализ и обобщение опыта разработки и аттестации отечественного и зарубежного стандартных образцов иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности выявили отличительные особенности отечественного стандартного. Они заключаются в двухкомпонентности и наличии аттестованных значений антикомплементарной активности для положительного и отрицательного контролей, выраженных в виде ($X_{ср.}$±2Sx) с доверительной вероятностью 0,95, что позволяет использовать данный стандартный образец для подтверждения стабильности аналитической работы методики и оценивать возможные тенденции к изменению процесса испытаний. Преимуществом зарубежного стандартного образца иммуноглобулина человека (BRP) является привлечение к участию в аттестационных исследованиях нескольких лабораторий.

Заключение. Определены два подхода в методологии разработки и проведения аттестационных исследований стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности, а также могут быть использованы производителями инфузионных лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека при разработке и аттестации стандартных образцов предприятия.

Ключевые слова: иммуноглобулин человека, антикомплементарная активность, специфическая безопасность, стандартные образцы.

Для цитирования: Кривых М.А., Корнилова О.Г., Хуснатдинова Е.А., Бунятян Н.Д., Олефир Ю.В. Методические подходы к разработке и аттестации стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности. Фармация, 2020; 69 (3): 36–43. ***https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-05***

METHODOLOGICAL APPROACHES TO DEVELOPING AND CERTIFYING A STANDARD HUMAN IMMUNOGLOBULIN SAMPLE TO DETERMINE ANTICOMPLEMENTARY ACTIVITY

M.A. Krivykh, O.G. Kornilova, E.A. Khusnatdinova, N.D. Bunyatyan, Yu.V. Olefir

Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation; 8, Petrovsky Boulevard, Build. 2, Moscow 127051, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Krivikh Maksim Andreevich – Chief Expert of the Division for Expert Evaluation of Allergenes, Cytokines and Other Immunomodulators of the Center for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation (SCEEMP), PhD. Тел.: +7 (909) 915-37-64. E-mail: Krivykh@expmed.ru. ***ORCID: 0000-0002-2003-1264***

Kornilova Ol'ga Gennagievna – Chief expert of the laboratory of immunoglobulin and blood products of Testing Centre for quality expertise of medical immunobiological preparatios for SCEEMP, PhD. Тел.: +7 (925) 352-61-03 E-mail: Kornilova@expmed.ru. ***ORCID: 0000-0003-1439-2052***

Khusnatdinova Ekaterina Aleksandrovna – Expert of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products Chief expert of the laboratory of immunoglobulin and blood products of Testing Centre for quality expertise of medical immunobiological preparatios for SCEEMP PhD. Тел.: +7 (915) 095-25-70 E-mail: Husnatdinova@expmed.ru. ***ORCID: 0000-0001-8493-9688***

Bunyatyan Nataliya Dmitrievna – Head of the Department of pharmaceutical technology and pharmacology of the First Moscow state medical UNIVERSITY. I. M. Sechenova (Sechenov University) Of The Ministry Of Health Of Russia, Chief Research associate of the Clinical Pharmacology Centre of the SCEEMP, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Тел.: +7 (916) 797-07-72. E-mail: ndbun@mail.ru. ***ORCID: 0000-0003-0936-5551***

Olefir Yuriiy Vital'evich – General Director of the SCEEMP, Doctor of Medical Sciences. Тел.: +7 (495) 625-43-42. E-mail: Olefir@expmed.ru. ***ORCID: 0000-0001-7652-4642***

SUMMARY

Introduction. The need to use standardized procedures for determining the specific safety of human immunoglobulin infusion formulations is due to the variability of critical parameters related to the use of biological reagents. Therefore, the problems with the development and certifying tests of standard samples are of particular relevance.

Objective: to analyze methodological approaches to developing and certifying a standard sample to determine the anticomplementary activity of human immunoglobulin preparations.

Material and methods. Standard samples of human immunoglobulin (foreign [Biological Reference Preparation (BRP) approved by the European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (France)] and Russian batches) were used. Methods for systematic analysis and document examination were applied. Anticomplementary activity was determined by a method based on the ability of human immunoglobulins to bind complement, by preventing the lysis of sensitized sheep red blood cells in the complement binding reaction.

Results. Comparative analysis and generalization of the experience in developing and certifying Russian and foreign standard human immunoglobulin samples for determining anticomplementary activity revealed the distinctive features of the Russian standard one. They lie in the two-component pattern and the presence of certified anticomplementary activity values for positive and negative controls, expressed as (X_{mean}±2Sx) with a 0.95 confidence interval, which makes it possible to use of this standard sample for confirming the stability of an analytical procedure and to evaluate possible trends to change the testing process. The advantage of the foreign standard sample of human immunoglobulin (BRP) is that several laboratories can be attracted to participate in certifying tests.

Conclusion. Two approaches were identified in the methodology for the development and certifying tests of a standard human immunoglobulin sample to determine anticomplementary activity, and can also be used by the manufacturers of human immunoglobulin infusion formulations to develop and certify standard samples of their enterprise.

Key words: human immunoglobulin, anticomplementary activity, specific safety, standard samples.

For reference: Krivykh M.A., Kornilova O.G., Khusnatdinova E.A., Bunyatyan N.D., Olefir Yu.V. Methodological approaches to developing and certifying a standard human immunoglobulin sample to determine anticomplementary activity. Farmatsiya, 2020; 69 (3): 36–43. ***https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-05***

Введение

Лекарственные препараты иммуноглобулинов человека входят в число наиболее широко используемых терапевтических белков во всем мире и пользуются повышенным спросом. Их можно применять внутривенно, внутримышечно или подкожно. Медицинское применение препаратов иммуноглобулинов че-

ловека в целом считается безопасным, однако, они могут привести к серьезным побочным эффектам, таким как анафилактические реакции или тромбоз, следовательно, требуются высокие стандарты качества к профилю их безопасности. Государственной фармакопеей Российской Федерации (ГФ РФ) предусмотрены высокие требования к специфической безопасности инфузионных лекарственных препаратов (ЛП) иммуноглобулинов человека [1], адекватная оценка которой позволяет минимизировать риск возникновения возможных нежелательных реакций при проведении иммуноглобулинотерапии. Показателями качества, характеризующими специфическую безопасность готовой лекарственной формы инфузионных ЛП иммуноглобулинов, являются такие понятия, как «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Антикомплементарная активность», «Анти-D антитела», «Активатор прекалликреина».

Необходимость использования стандартизованных методик, обеспечивающих единообразие процедуры проведения и оценки выполнения испытания, обусловлена вариабельностью критических параметров, связанных с использованием биологических реагентов. При определении антикомплементарной активности (АКА) таковыми являются эритроциты барана, комплемент морских свинок и гемолитическая сыворотка [2]. Стандартизация методики определения АКА достигается использованием фармакопейного метода Европейской фармакопеи (ЕФ), ГФ РФ и др. с применением стандартного образца (СО) соответствующей квалификации. Фармакопейным требованием к инфузионным ЛП иммуноглобулинов человека является соответствие уровня их АКА ≤1 СН50/мг белка (что соответствует ≤50%).

В настоящее время на территории Российской Федерации зарегистрировано 21 наименование инфузионных ЛП иммуноглобулинов человека, из них 6 наименований ЛП производятся отечественными предприятиями [3]. Анализ методик определения АКА, используемых отечественными и зарубежными производителями, показал, что зарубежными производителями охват стандартизацией составляет 100%, отечественными производителями – 66,7%. Контроль качества двух ЛП отечественного производства подразумевает использование методики [4], введенной в действие в 1988 г., которая не позволяет оценить соответствие ЛП иммуноглобулинов человека современным международным требованиям, т.к. предусматривает определение АКА как «сохранение активности 2 гемолитических единиц в присутствии 10 мг белка иммуноглобулина» и не предусматривает использование стандартного образца. Нормативная документация на инфузионные ЛП иммуноглобулинов человека как отечественного, так и зарубежного производства предусматривает использование стандартных образцов: BRP, ОСО 42–28–430, СО предприятия. СО иммуноглобулина человека BRP (СО ЕФ) впервые был разработан и утвержден в 1995 г. после проведения межлабораторных исследований по аттестации [5]. Отечественный СО иммуноглобулина человека (ОСО 42–28–430) разработан и утвержден в 2014 г. [6]. В случае использования СО предприятия значение их аттестованных характеристик должно прослеживаться к СО более высокого порядка [7], а информация об их разработке и аттестации должна содержаться в материалах регистрационного досье на ЛП.

Целью настоящего исследования являлся анализ методических подходов к разработке и аттестации стандартного образца для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека.

Материал и методы

В исследовании использовали стандартный образец иммуноглобулина человека (BRP): серия 1 (кат. № Y0001504), серия 1 (кат. № Y0001994), утвержденные Европейским директоратом по качеству лекарственных средств и здравоохранения, Франция (European Directorate for the Quality of Medicines, EDQM) и отечественный стандартный образец иммуноглобулина человека (ОСО 42–28–430), серии 1–3, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Указанные СО имеют различные диапазоны аттестованных значений для отрицательного и положительного контроля.

Применяли методы системного анализа и документальной экспертизы. Для определения АКА использовали метод, основанный на способности иммуноглобулинов человека связывать комплемент, препятствуя лизису сенсибилизированных эритроцитов барана в реакции связывания комплемента [8, 9]. Расчет статистических параметров (среднего значения, стандартного отклонения, доверительного интервала) с доверительной вероятностью 0,95 выполняли по Гланцу [10], используя программное обеспечение MS Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Проведенные информационно-аналитические исследования позволили выявить, что в разные годы различные серии СО иммуноглобулина человека BRP согласно информации, указанной в инструкции по применению, подразумевали его использование не только при определении антикомплементарных свойств иммуноглобулина, но также при определении молекулярных параметров (молекулярно-массовое распределение молекул с помощью метода ВЭЖХ) и для определения целостности Fc-функции иммуноглобулина [5, 11–14]. За более чем 25-летний период применения различных серий данного СО наблюдалась тенденция к увеличению количества лиофилизированного материла во флаконе и изменение диапазонов значений отрицательного и положительного контролей (табл. 1).

Сравнительный анализ отечественного и зарубежного СО иммуноглобулина человека для определения АКА позволил выявить сходства и различия в методических подходах в разработке и аттестации (табл. 2) и способах использования (см. рисунок).

Несомненным преимуществом СО иммуноглобулина человека BRP является привлечение к участию в аттестационных исследованиях нескольких лабораторий. Зарубежный СО перед использованием восстанавливают в заданном количестве (указано в листке-вкладыше к СО) воды очищенной и получают раствор с содержанием белка примерно 50 мг/мл (примерное содержание белка в ряде случаев может негативно повлиять на результаты определения и потребовать подтверждения количественного содержания белка в полученном растворе). Отечественный СО не требует пробоподготовки, т.к. представляет собой раствор иммуноглобулина человека с содержанием белка 100 мг/мл (дополнительная аттестованная характеристика). Кроме того различны подходы к формированию отрицательного и положительного контролей, так при использовании СО иммуноглобулина человека BRP контрольные пробы для инкубации формируются путем изменения количества исходного раствора СО (4-кратное увеличение количества исходного материла для получения положительного контроля) [14].

Отечественный СО представляет собой двухкомпонентный набор, состоящий из ампулы с раствором иммуноглобулина – отрицательный контроль и ампулы с раствором иммуноглобулина, полученным после специальной обработки – положительный контроль (Патент РФ №2577703), при формирования контрольных проб для инкубации используется одинаковое количество СО (по 0,1 мл) из соответствующей ампулы.

Таблица 1

Обзор стандартных образцов иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи

Table 1

Review of European Pharmacopoeia standard human immunoglobulin samples

№ серии (кат. №)	Год утверждения	Количество во флаконе, г (объем растворителя, мл)	Аттестованный диапазон значений антикомплементарной активности, %		Дополнительный аттестованный параметр
			отрицательный контроль	положительный контроль	
1 (H1000000)	1995	0,5 (10,0)	5–35	50–100	Молекулярные параметры и Fc-функции иммуноглобулина
2 (H0990000)	2001	1,0 (20,0)	10–30	50–100	Молекулярные параметры и Fc-функции иммуноглобулина
3 (H0990000)	2005	6,0 (105,4)	10–40	60–100	Fc-функции иммуноглобулина
1 (Y0001504)	2011	6,0 (105,4)	10–40	60–100	Молекулярные параметры
1 (Y0001994)	2018	10,0 (180,4)	10–40	60–100*	–

Примечание: * – объем пробы увеличен с 0,6 мл до 0,8 мл.
Note: * the sample volume is increased from 0.6 ml to 0.8 ml.

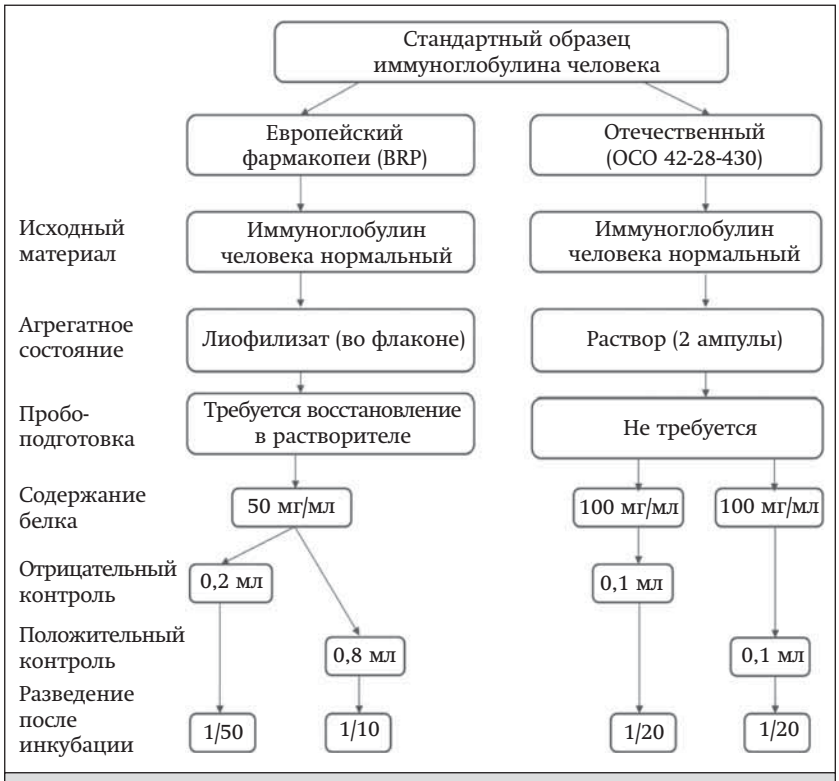
Таблица 2

Методические подходы к разработке стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности

Table 2

Methodological approaches to developing a standard human immunoglobulin sample to determine anticomplementary activity

Параметр сравнения	Стандартный образец Европейской фармакопеи [14]	Отечественный стандартный образец
Исходный материал	Коммерческая серия препарата иммуноглобулина	Коммерческая серия препарата иммуноглобулина
Комплектность	Однокомпонентный	Двухкомпонентный
Предварительные исследования исходного материала	Для подтверждения возможности использования в качестве положительного контроля	Для подтверждения возможности использования в качестве отрицательного контроля
Дизайн аттестационных исследований	В условиях воспроизводимости с привлечением нескольких лабораторий	В условиях внутрилабораторной прецизионности (с участием нескольких операторов, использованием различного оборудования и реактивов)
Статистическая обработка результатов	Каждой лабораторией и централизовано	Статистическая обработка по достижению достаточного объема выборки (не менее 20 независимых результатов)
Изучение стабильности после вскрытия первичной упаковки	Подтверждена возможность использования в течение 14 дней после восстановления лиофилизата	Подтверждена возможность использования в течение 14 дней после вскрытия ампул



Сравнительный анализ стандартных образцов иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности
Comparative analysis of standard human immunoglobulin samples to determine anticomplementary activity

Несмотря на то, что в аттестационных исследованиях СО иммуноглобулина человека BRP участвует несколько лабораторий (от 7 до 17), анализ публикаций [5, 11–14], содержащих первичные данные с результатами исследований, свидетельствует о том, что у некоторых лабораторий, принимающих участие в испытаниях, получены значения АКА для отрицательного и положительного контролей не соответствующие заданному диапазону, которые в дальнейшем не учитываются в статистической обработке результатов. В ходе предварительных исследований исходного материала-кандидата в СО (серия 1, кат. № Y0001994) показано, что использование 0,6 мл исходного материала СО часто приводило к получению значений АКА ниже, чем действующие требования для положительного контроля (60–100%). Полученные результаты исследования были связаны

Таблица 3

Антикомплементарная активность стандартных образцов (BRP), полученная в межлабораторных исследованиях EDQM

Table 3

Anticomplementary activity of standard samples (BRP), obtained in the EDQM interlaboratory studies

№ серии	Количество лабораторий, участвовавших в межлабораторных исследованиях	Количество выполненных повторов	Значения антикомплементарной активности $X_{ср.}$±Sx (n – количество повторов, учтенное в статистической обработке), %	
			отрицательный контроль	положительный контроль
1 (H1000000)	16	58	20,8±7,6 (n=46) CV=36,5%	74,3±9,9 (n=46) CV=13,3%
		18*	22,2±3,5 (n=14)* CV=15,8%	76,3±10,4 (n=14)* CV=13,6%
2 (H0990000)	15	35	21,7±4,8 (n=26) CV=22,1%	76,3±12,8 (n=26) CV=16,8%
		29*	21,5±5,2 (n=17)* CV=24,2%	74,8±15,9 (n=17)* CV=21,3%
3 (H0990000)	17	34	25,8±7,4 (n=28) CV=28,7%	78,0±9,6 (n=28) CV=12,3%
		30*	21,5±7,0 (n=27)* CV=32,6%	76,6±10,2 (n=27)* CV=13,3%
1 (Y0001504)	8	30	20,4±6,6 (n=24) CV=32,4%	69,7±10,5 (n=24) CV=15,1%
1 (Y0001994)	7	72	23,3±6,8 (n=56) CV=29,2%	90,4±3,3 (n=56) CV=3,7%

Примечание: * – значения, полученные при использовании реактива «Комплемент морских свинок in house»; CV – коэффициент вариации.
Note. * – the values obtained when using «in-house guinea pig complement»; CV – coefficient of variation.

с вариабельностью критических параметров, а именно – комплемента морских свинок. С целью исключения возможности получения результатов, находящихся на нижней границе предписанного диапазона, что может привести к ложной оценке испытаний как недействительных, было рекомендовано использование большего объема СО (0,8 мл) при формировании положительного контроля. Кроме того, СО иммуноглобулина человека BRP (кат. №H1000000, H0990000, Y0001504) характеризуется значительной вариабельностью получаемых результатов, так коэффициент вариации для отрицательного контроля различных серий составляет от 15,8 до 36,5%, для положительного контроля – от 12,3 до 16,8% [13], чем, вероятнее всего, объясняется отсутствие аттестованных значений с установленной погрешностью для соответствующего контроля СО (табл. 3).

Следует отметить, что изменение способа использования СО (кат. №Y0001994) в сторону увеличения количества исходного материла для получения положительного контроля также повлияло на коэффициент вариации получаемых значений (CV=3,7 %).

По результатам собственных исследований, выполненных в лаборатории НЦЭСМП Минздрава России с использованием СО иммуногло-

Таблица 4

Аттестованные значения антикомплементарной активности отечественного стандартного образца иммуноглобулина человека различных серий [10, 15, 16]

Table 4

Certified values of the anticomplementary activity of the Russian standard sample of human immunoglobulin of various batches [10, 15, 16]

№ серии	Аттестованные значения антикомплементарной активности, % (доверительная вероятность 0,95)		Содержание белка, мг/мл	Срок годности, год
	отрицательный контроль	положительный контроль		
1	41,5±3,6	78,2±4,6	102,0±1,8	1,5
2	40,5±7,2	76,6±6,2	103,1±3,6	1,5
	41,6±7,2	75,7±6,8		2,5
3	38,7±9,0	69,9±9,6	98,4±3,3	2,5

булина человека BRP серии 1 (кат. №Y0001504), получены следующие значения для отрицательного контроля 18,5±3,6 (n=9; CV=19,5 %); для положительного контроля 83,3±4,0 (n=9; CV=4,8%); серии 1 (кат. №Y0001994) получены следующие значения для отрицательного контроля 27,7±6,1 (n=12; CV=22,0%); для положительного контроля 87,6±3,6 (n=12; CV=4,1%).

Отличительной особенностью отечественного СО иммуноглобулина человека является наличие аттестованных значений АКА для положительного и отрицательного контролей, выраженных в виде ($X_{ср.}$±2Sx) с доверительной вероятностью 0,95; результаты аттестации различных серий представлены в табл. 4.

В проведенных исследованиях [16] было установлено, что использование контрольных карт Шухарта и отечественного СО иммуноглобулина человека позволяет подтвердить стабильность аналитической работы методики при проведении испытаний лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека по показателю качества «Антикомплементарная активность» и оценить возможные тенденции к изменению процесса испытаний.

Заключение

Таким образом, проведенный анализ позволил выявить два подхода в методологии разработки и проведения аттестационных исследований стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности, которые имеют свои особенности, сходства и различия, а также могут быть использованы производителями инфузионных лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека при разработке и аттестации стандартных образцов предприятия, применение которых в повседневной рутинной деятельности экономически более целесообразно.

* * *

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Государственная фармакопея РФ XIV изд., ФС.3.3.2.0008.15 «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения». [Электронное издание]. Режим доступа: http://femb.ru/feml

2. Buchacher A., Schluga P., Mullner J. et al. Anticomplementary activity of IVIG concentrates – important assay parameters and impact of IgG polymers. Vox Sang. 2010; 98: 209–18. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01271.x

3. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] Режим доступа: http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx (дата обращения: 25.07.2019)

4. Определение антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов. Методические рекомендации МЗ РСФСР. Горький. 1988; 1–12.

5. Sandberg E. Collaborative study for establishment of human immunoglobulin biological reference preparation (BRP). Pharmeuropa Special Issue Bio. 1996; 1: 49–69.

6. Кривых М.А., Корнилова О.Г., Бунятян Н.Д. и др. Аттестация стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности. Химико-фармацевтический журнал. 2016; 50 (12): 61–4.

7. Бондарев В.П., Борисевич И.В., Волкова Р.А. и др. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. Ведомости НЦЭСМП. 2013; 2: 28–32. DOI: 10.30895/1991-2919-2013-0-2

8. Государственная фармакопея РФ XIV изд., ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения». [Электронное издание]. Режим доступа: http://femb.ru/feml

9. European Pharmacopoeia 9.1, 01/2010:20617 corrected 7.6 «Test for anticomplementary activity of immunoglobulin». [Электронное издание]. Режим доступа: http://online6.edqm.eu/ep901/# (дата обращения: 25.07.2019).

10. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1999; 459.

11. Sandberg E., Daas A., Esposito-Farese M.E. Collaborative study for establishment of human immunoglobulin European pharmacopoeia biological reference preparation batch 2. Pharmeuropa Special Issue Bio. 2001; 1: 27–42.

12. Sandberg E., Behr-Gross M.-E., Daas A. Collaborative study to establish human immunoglobulin BRP batch 3 and human immunoglobulin (molecular size) BRP Batch 1. Pharmeuropa Bio. 2006; 1: 37–48.

13. Sandberg E., Costanzo A., Daas A. et al. Calibration of the human immunoglobulin BRPs for ACA and molecular size (batch 1) and for Fc function and molecular size (batchs 1&2). Pharmeuropa Bio&SN. 2012; 1–15.

14. Karra D., Regourd E., Costanzo A. Collaborative study for the establishment of the human immunoglobulin BRP replacement batches. Pharmeuropa Bio&Sci Notes. 2018; 3: 37–61.

15. Корнилова О.Г., Кривых М.А., Хуснатдинова Е.А. и др. Изучение возможности увеличения срока годности стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2017; 17 (2): 110–5.

16. Корнилова О.Г., Хуснатдинова Е.А., Коновалова Е.С. и др. Оценка стабильности аналитической работы методики определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2019; 19 (2): 118–23. DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-2-118-123

References

1. The State Pharmacopoeia of The Russian Federation, XIV-ed., PM.3.3.2.0008.15 «Normal human immunoglobulin for intravenous administration» [Electronic resource]. Access mode: http://femb.ru/feml (in Russian)

2. Buchacher A., Schluga P., Mullner J. et al. Anticomplementary activity of IVIG concentrates – important assay parameters and impact of IgG polymers. Vox Sang. 2010; 98: 209–18. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01271.x

3. State Register of Medicines [Electronic resource]. Access mode: http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx [accessed 25 July 2019] (in Russian)

4. Determination of anticomplementary activity of immunoglobulin preparations, Methodical recommendations. MH RSFSR. Gorkiiy, 1988: 1–12 (in Russian).

5. Sandberg E. Collaborative study for establishment of human immunoglobulin biological reference preparation (BRP). Pharmeuropa Special Issue Bio, 1996; 1: 49–69.

6. Krivykh M.A., Kornilova O.G., Bunyatyan N.D. et al. Certification of standard samples of human immunoglobulin for determination of anticomplementary activity. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal, 2016; 50 (12): 61–4 (in Russian).

7. Bondarev V.P., Borisevich I.V., Volkova R.A. et al. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. Vedomosti SCEMAP. 2013; 2: 28–32. DOI: 10.30895/1991-2919-2013-0-2 (in Russian).

8. The State Pharmacopoeia of The Russian Federation, XIV-ed., GPM «Determination of the anticomplementary activity of human immunoglobulin-containing medicinal products for intravenous administration». [Electronic resource]. Access mode: http://femb.ru/feml (in Russian)

9. European Pharmacopoeia 9.1, 01/2010:20617 corrected 7.6 «Test for anticomplementary activity of immunoglobulin». [Electronic resource]. Access mode: http://online6.edqm.eu/ep901/# (accessed 25 July 2019)

10. Glantz S., Primer of Biostatistics. McGraw-Hill. New York; 1997. (Russian translation). M.: Praktika, 1999; 459 (in Russian)

11. Sandberg E., Daas A., Esposito-Farese M.E. Collaborative study for establishment of human immunoglobulin European pharmacopoeia biological reference preparation batch 2. Pharmeuropa Special Issue Bio. 2001; 1: 27–42.

12. Sandberg E., Behr-Gross M.-E., Daas A. Collaborative study to establish human immunoglobulin BRP batch 3 and human immunoglobulin (molecular size) BRP Batch 1. Pharmeuropa Bio. 2006; 1: 37–48.

13. Sandberg E., Costanzo A., Daas A. et al. Calibration of the human immunoglobulin BRPs for ACA and molecular size (batch 1) and for Fc function and molecular size (batchs 1&2). Pharmeuropa Bio&SN. 2012; 1–15.

14. Karra D., Regourd E., Costanzo A. Collaborative study for the establishment of the human immunoglobulin BRP replacement batches. Pharmeuropa Bio&Sci Notes. 2018; 3: 37–61.

15. Kornilova O.G., Krivykh M.A., Husnatdinova E.A. et al. Contemplation of the possibility of extending the shelf life of human immunoglobulin reference standard used for determination of anticomplementary activity. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2017; 17 (2): 110–5 (in Russian).

16. Kornilova O.G., Khusnatdinova E.A., Konovalova E.S. et al. Evaluation of the Stability of Performance of the Analytical Test Method Used for Determination of Anticomplementary Activity of Human Immunoglobulin Preparations. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2019; 19 (2): 118–23. DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-2-118-123 (in Russian).

***Поступила** 6 сентября 2019г.*
***Received** 6 September 2019*

***Принята к публикации** 27 декабря 2019г.*
***Accepted** 27 December 2019*

https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-06

© Коллектив авторов, 2020
УДК 615.322:582.29].074

Определение усниновой кислоты в слоевищах лишайника рода *Cladonia* методом ВЭЖХ-УФ

А.В. Никулин[1], С.И. Ямщикова[2], О.Г. Потанина[1], Р.А. Абрамович[1]

[1]Российский университет дружбы народов,
Центр коллективного пользования (Научный образовательный центр),
Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;
[2]Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Медицинский институт,
Российская Федерация, 677000, Якутск, ул. Ойунского, д. 27

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Никулин Александр Владимирович – заведующий лабораторией физико-химических методов исследований Центра научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра) Российского университета дружбы народов (ЦКП (НОЦ) РУДН), кандидат химических наук. Тел.: +7 (916) 019-77-05. E-mail: r251@yandex.ru. ***ORCID: 0000-0002-8490-444X***

Ямщикова Саргылана Ивановна – аспирант ЦКП (НОЦ) РУДН, ассистент кафедры фармакологии и фармации Медицинского института Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. Тел. +7 (914) 223-83-82. E-mail: ssontoeva@gmail.ru. ***ORCID: 0000-0001-7970-0816***

Потанина Ольга Георгиевна – заведующая кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии, директор ЦКП (НОЦ) РУДН, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (967) 140-78-77, E-mail: microly@mail.ru. ***ORCID: 0000-0002-0284-419X***

Абрамович Римма Александровна – заведующая кафедрой технологии получения лекарств и организации фармацевтического дела факультета повышения квалификации медицинских работников, директор ЦКП (НОЦ) РУДН, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 694-50-49. E-mail: abr-rimma@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Ягель, представляющий собой совокупность лишайников рода *Cladonia*, содержит биологически активные вещества (лишайниковые кислоты, фенольные соединения и др.), обладающие антибактериальными и противовирусными свойствами. Натриевые соли усниновой кислоты давно используются в фармацевтической практике. Для определения усниновой кислоты в растительном материале используются различные методы: тонкослойная хроматография (ТСХ), твердофазный иммунофлюоресцентный анализ (ИФА), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с масс-спектрометрией (МС) и др. Ягель не является официнальным сырьем и оценка его по содержанию усниновой кислоты отсутствует.

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения усниновой кислоты в слоевищах лишайника рода *Cladonia*.

Материал и методы. Объектом изучения были образцы слоевищ ягеля, собранные в Республике Саха (Якутия). Усниновую кислоту определяли методом ВЭЖХ/УФ.

Результаты. Разработана и валидирована методика количественного определения усниновой кислоты в слоевищах лишайника рода *Cladonia* методом ВЭЖХ с ошибкой определения ±4,47%.

Заключение. Показана перспективность разработанной методики для анализа субстанции растительного происхождения на содержание усниновой кислоты. С ее помощью установлено, что содержание усниновой кислоты в слоевищах ягеля, произрастающего в разных районах Якутии колеблется от 0,88 до 1,02%.

Ключевые слова: усниновая кислота, слоевища лишайника рода *Cladonia*, количественное определение, ВЭЖХ-УФ.

Для цитирования: Никулин А.В., Ямщикова С.И., Потанина О.Г., Абрамович Р.А. Определение усниновой кислоты в слоевищах лишайника рода *Cladonia* методом ВЭЖХ-УФ. Фармация, 2020; 69 (3): 44–49. ***https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-06***

DETERMINATION OF USNIC ACID IN THE BLASTEMAS OF A LICHEN OF THE GENUS *CLADONIA* BY HPLC/UV

A.V. Nikulin[1], S.I. Yamshchikova[2], O.G. Potanina[1], R.A. Abramovich[1]

[1]Collective Usage Center (Research Educational Center), People's Friendship University of Russia; 6, Miklukho-Maklai St., Moscow 117198, Russian Federation

[2]Medical Institute, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University; 27, Oiunsky St., Moscow 677000, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nikulin Alexander Vladimirovich – Head of the Laboratory of physicochemical method of the Shared Research and Education Center of the Peoples' friendship university of Russia (PFUR), PhD (Chem.). Tel.: +7 (916) 019-77-05. E-mail: r251@yandex.ru. ***ORCID: 0000-0002-8490-444X***

Yamshchikova Sargylana Ivanovna – postgraduate student of the Shared Research and Education Center of the Peoples' friendship university of (PFUR), assistant of department of pharmacology and pharmacy of Medical institute of North-Eastern Federal University of M.K. Ammosov. Tel.: +7 (914) 223-83-82. E-mail: ssontoeva@gmail.ru. ***ORCID: 0000-0001-7970-0816***

Potanina Olga Georgievna – Head of the pharmaceutical chemistry and pharmacognosy chair, Director of the Research and Development department of the Shared Research and Education Center of the PFUR, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (967) 140-78-77. E-mail: microly@mail.ru. ***ORCID: 0000-0002-0284-419X***

Abramovich Rimma Aleksandrovna – Head of drugs technology and pharmacy management chair of Advanced Training Faculty of medical employee, Director Shared Research and Educational Center of the PFUR, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (916) 694-50-49. E-mail: abr-rimma@yandex.ru

SUMMARY

Introduction. Cup moss that is a combination of lichens of the genus ***Cladonia*** contains biologically active substances (usnic acids, phenolic compounds, etc.) that have antibacterial and antiviral properties. The sodium salts of usnic acid have long been used in pharmaceutical practice. Various methods (TLC, ELISA, HPLC/MS, etc.) are used to determine usnic acid in plant materials. Cup moss is not an officinal raw material and its estimation by the content of usnic acid is absent.

Objective: to develop and validate a procedure for the quantitative determination of usnic acid in the blastemas of the lichen of the genus ***Cladonia***.

Material and methods. The investigation object was cup moss samples collected in the Republic of Sakha (Yakutia). Usnic acid was determined by HPLC-UV.

Results. A procedure for the quantitative determination of usnic acid in the blastemas of the lichen of the genus ***Cladonia*** was developed and validated by HPLC with a measurement error of ±4.47%.

Conclusion. The developed method was shown to be promising in analyzing the plant substance for the levels of usnic acid. With its usage, it was found that the content of usnic acid in the blastemas of the cup moss growing in different regions of Yakutia ranges from 0.88 to 1.02%.

Key words: usnic acid, blastemas of the lichen of genus ***Cladonia***, quantification, HPLC-UV.

For reference: Nikulin A.V., Yamshchikova S.I., Potanina O.G., Abramovich R.A. Determination of usnic acid in the blastemas of a lichen of the genus ***Cladonia*** by HPLC-UV. Farmatsiya, 2020; 69 (3): 44–49. ***https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-06***

Введение

Одним из растений, о лекарственных свойствах которого издавна известно на Севере, является ягель, представляющий собой совокупность лишайников рода *Cladonia*. В слоевищах ягеля обнаружены полисахариды, фенольные вещества, лишайниковые кислоты – усниновая, леканоровая, перлатолиевая и др. [1, 2]. Доказано, что усниновая кислота обладает высокими антибактериальными, противотуберкулезными, противовирусными свойствами [3]. Натриевые соли усниновой кислоты давно используются в фармацевтической практике. Так, в Российской Федерации известен препарат «Бинан». Ввиду постоянно растущей антибиотикорезистентности особенно актуальна разработка новых лекарственных средств (ЛС) на основе субстанций природного происхождения, содержащих антибактериальные компоненты.

Ягель не является фармакопейным сырьем. В настоящее время нет удовлетворительной методики, разработанной с учетом современных возможностей аналитической химии, пригодной для количественного определения и последующей стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Для определения усниновой кислоты в растительном материале используются: для качественного анализа – тонкослойной хроматографии (ТСХ) в слое микрокристаллической целлюлозы в системе растворителей н-бутанол–уксусная кислота–вода [4–6], для количественного иммуноферментного аналиаз путем конъюгации альбумина саналитом в условиях формальдегидной конденсации [7] и др. Усниновую кислоту определяют также методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ. Для анализа лишайниковых метаболитов в качестве подвижных фаз применяли муравьиную кислоту и метиловый спирт [8]. Однако данная методика имеет ряд существенных недостатков, в частности, метиловый спирт в фармацевтической практике нежелательно применять в качестве экстрагента из-за фармакологической неиндифферентности, подвижные фазы сложны по составу, а использовать такое оборудование, как ультра-ВЭЖХ-МС, слишком дорого для рутинных анализов. В литературе есть описание ВЭЖХ-методики, позволяющей ла достигнуть хорошего разрешения между аналитами, но она была апробирована только на модельных смесях лишайниковых веществ [9].

Цель данной работы – разработка и валидация методики количественного определения усниновой кислоты методом ВЭЖХ-УФ в слоевищах лишайника рода *Cladonia* и оценка ее основных метрологических характеристик.

Материал и методы

Объект исследования – образцы слоевищ ягеля, собранные в Республике Саха (Якутия) летом 2016 г. При разработке методики количественного определения усниновой кислоты опирались на данные G.B. Feige. и H.T. Lumbsch [9], которые подобрали условия хроматографического разделения лишайниковых кислот. Усниновую кислоту определяли с помощью хроматографа Varian Pro Star, колонка Phenomenex Luna 5μ C18(2), 250×4,6 мм, подвижные фазы – ПФ А: 1% раствор ортофосфорной кислоты; ПФ В: метиловый спирт; скорость потока элюента – 0,7 мл/мин; температура колонки – 40°С; детектор – УФ (длина волны – 285 нм); объем аликвоты – 20 мкл; время хроматографирования – 80 мин. Хроматографический градиент представлен в табл. 1.

Результаты и обсуждение

В ходе изучения влияния различных факторов на полноту извлечения усниновой кислоты из слоевищ *Cladonia* (табл. 2) установлено, что наилучшее извлечение усниновой кислоты достигается при степени измельчения субстанции растительного происхождения 0,5 мм, концентрации этилового спирта в экстрагенте 70%, соотношении сырье–экстрагент 1:100, времени экстракции 30 мин, кратности экстракции 2.

На основании полученных данных была разработана ***методика количественного определения усниновой кислоты в слоевищах Cladonia***:

- *Раствор СО усниновой кислоты.* Около 0,01 г (точная навеска) СО усниновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 15 мл метилового спирта, нагревают до растворения, охлаждают, объем раствора доводят тем же растворителем до метки, перемешивают.
- 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводят метиловым спиртом до метки, перемешивают, фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор – 0,45 мкм) в виалу, отбрасывая первые 1–2 мл фильтрата.

Таблица 1

Хроматографический градиент методики

Table 1

Chromatography gradient in the procedure

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0	70	30
1	70	30
15	30	70
45	0	100
63	70	30
80	70	30

Таблица 2

Влияние параметров экстракции на полноту извлечения усниновой кислоты из сырья *Cladonia* (n=3; p=0,95)

Table 2

Impact of extraction parameters on the completeness of usnic acid extraction from *Cladonia* raw materials (n=3; p=0.95)

Концентрация этилового спирта	Измельченность сырья, мм	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание усниновой кислоты, %
20	0,5	1:100	60	0,13±0,01
40				0,47±0,02
70				0,87±0,02
90				0,42±0,02
40	0,5	1:100	60	0,46±0,02
	1			0,37±0,03
	2			0,36±0,03
	3			0,28±0,02
	5			0,20±0,02
	7			0,21±0,03
70	0,5	1:50	60	0,43±0,02
		1:100		0,50±0,02
		1:200		0,13±0,03
		1:250		0,08±0,02
70	0,5	1:100	30	0,45±0,03
			60	0,41±0,02
			90	0,39±0,01
			120	0,39±0,02
70	0,5	1:100	30	0,45±0,03
			30	0,49±0,01
			30	0,50±0,01

Испытуемый раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл этилового спирта 70%, присоединяют к обратному холодильнику и кипятят в течение 30 мин на водяной бане. Извлечение охлаждают, фильтруют через 5 слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл, процедуру экстракции повторяют. Полученные извлечения объединяют. Объем раствора доводят этиловым спиртом 70% до метки, перемешивают (раствор А).

1 мл раствора А помешают в мерную колбу вместимостью 10 мл, объем раствора доводят этиловым спиртом до метки, перемешивают (раствор Б). Раствор Б фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор – 0,45 мкм) в виалу, отбрасывая первые 1–2 мл фильтрата.

Последовательно хроматографируют испытуемый раствор (раствор Б) и раствор СО усниновой кислоты не менее 3 раз, регистрируют хроматограммы.

Содержание усниновой кислоты (X %) в препарате, рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{S \cdot a_0 \cdot 80 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где S – площадь пика усниновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; S_o – площадь пика на хроматограмме раствора СО усниновой кислоты; а – навеска сырья, г; a_o – навеска СО усниновой кислоты; г; Р – содержание основного вещества в СО усниновой кислоты; %; W – влажность сырья, %.

Валидация методики количественного определения усниновой кислоты в слоевищах *Cladonia* методом ВЭЖХ проводилась по параметрам: эффективность хроматографической системы, специфичность, линейность правильность.

Для оценки специфичности методики количественного определения усниновой кислоты получены хроматограммы растворителя, стандартного раствора и испытуемого раствора (рис. 1–3). Хроматограммы растворителя свидетельствуют об отсутствии влияния растворителя на результаты количественного определения усниновой кислоты. Время удерживания пика усниновой кислоты на хроматограммах стандартного и испытуемого раствора совпадают с точностью >99,0% (табл. 3).

Установлено, что эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пику усниновой кислоты на хроматограммах раствора стандартного образца, не менее 3000 теоретических тарелок. Фактор асимметрии пика усниновой кислоты на хроматограммах стандартного раствора составляет ≥0,8 и ≤1,5. Относительное стандартное отклонение (RSD) значений времен удерживания на хроматограммах

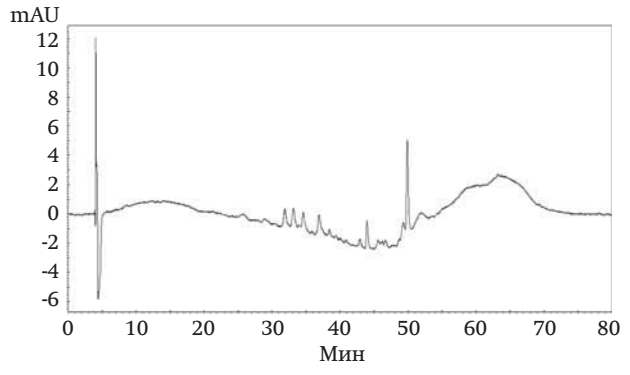


Рис. 1. Типичная хроматограмма растворителя
Fig. 1. Typical solvent chromatogram

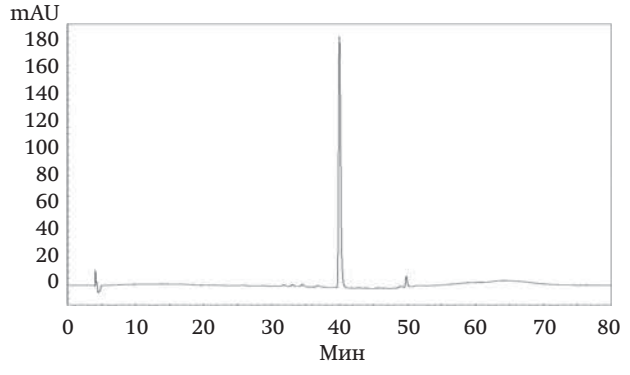


Рис. 2. Типичная хроматограмма стандартного раствора усниновой кислоты
Fig. 2. Typical chromatogram of a standard usnic acid solution

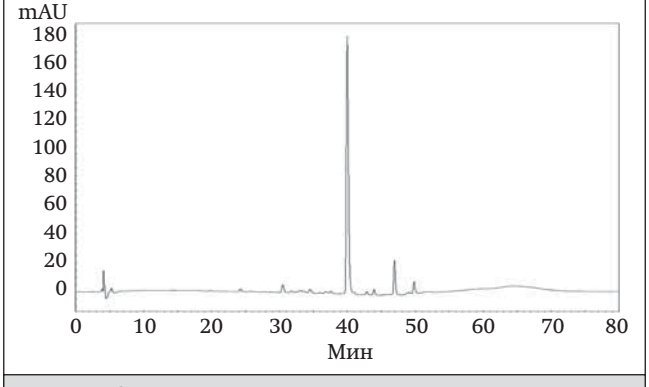


Рис. 3. Типичная хроматограмма испытуемого раствора слоевищ ягеля
Fig. 3. A typical chromatogram of a test cup moss blastema solution

Таблица 3

Специфичность методики определения усниновой кислоты

Table 3

Specificity of the procedure for determination of usnic acid

Время удерживания	Стандартный раствор	Испытуемый раствор	Совпадение, %
RT_1	39,99	39,93	99,9
RT_2	39,95	39,95	100,0
RT_3	39,97	39,97	100,0

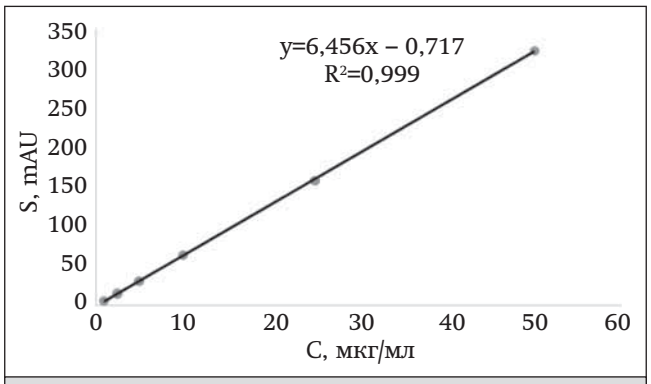


Рис. 4. Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации усниновой кислоты в растворе
Fig. 4. The linear relationship of the analytical signal to the concentration of usnic acid in solution

стандартного раствора усниновой кислоты при n=5 не превышает 2,0%, площадей пиков – не более 4%.

Для определения линейности методики готовили серии растворов стандартного образца усниновой кислоты в пределах от 1 до 50 мкг/мл. График приведен на рис. 4. Коэффициент корреляции составляет R^2=0,9999, что подтверждает линейность методики количественного определения усниновой кислоты.

Правильность методики количественного определения усниновой кислоты доказывали методом добавок. Согласно анализу полученных данных (табл. 4), правильность количественного определения усниновой кислоты для средней величины каждого из 3 определений находится в диапазоне от 95,0 до 105,0%. Коэффициент вариации количественного определения усниновой кислоты при n=9 не превышает 2,0%.

На основании метрологических характеристик разработанной методики количественного определения усниновой кислоты в слоевищах ягеля (табл. 5) установили, что ошибка определения не превышает 5%.

Разработанная методика была использована для определения содержания усниновой кислоты в образцах ягеля, собранного в разных районах Якутии (табл. 6).

Таблица 4

Правильность определения усниновой кислоты

Table 4

The accuracy of determination of usnic acid

Концентрация раствора добавки в 1 образце, мкг/мл	$S_{добавки}$	Ожидаемое S	Найдено S	Открываемость, %
5	20,3867	50,3272	50,8979	101,13
5	21,0852	51,0257	52,1452	102,19
5	20,6547	50,5952	51,0464	100,89
10	41,04266	70,9831	71,2217	100,33
10	41,6504	71,5909	71,42	99,76
10	40,9247	70,8652	71,6449	101,10
40	212,1647	242,1052	245,6099	101,44
40	197,2946	227,2351	228,0952	100,37
40	199,2734	229,2139	230,3551	100,49

Примечание. Данные для усниновой кислоты, содержащейся в спиртовом извлечении из слоевищ *Cladonia*: – a=1,0054 г, S=29,9405
Note. Data for usnic acid contained in alcohol extract from *Cladonia* lichen blastemas: – a=1.0054 g, S=29.9405

Заключение

Разработана и валидирована методика количественного определения усниновой кислоты в слоевищах лишайника рода *Cladonia* методом ВЭЖХ с ошибкой определения ±4,47%. Показана перспективность разработанной методики для анализа субстанции растительного происхождения на содержание усниновой кислоты. Согласно полученным результатам, содержание усниновой кислоты в слоевищах ягеля, произрастающего в разных районах Якутии, колеблется от 0,88 до 1,02%.

Результаты были получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России (FSRG-2020-0019).

The results were obtained as part of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia (FSRG-2020-0019).

Таблица 5

Метрологические характеристики разработанной методики

Table 5

Metrological characteristics of the developed procedure

f	W, %	$\bar{X}$, %	s	P, %	t (p, f)	$\Delta\bar{X}$	E, %
5	8,0	0,78	0,03	95	2,57	0,03	4,47

Таблица 6

Содержание усниновой кислоты в образцах *Cladonia* (n=3, p=0,95)

Table 6

Usnic acid levels in *Cladonia* samples (n=3; p=0.95)

Район заготовки сырья	Содержание усниновой кислоты, %
Томпонский	0,93±0,02
Таттинский	0,96±0,02
Олекминский	0,96±0,02
с. Владимировка	1,02±0,02
Лесничество	0,88±0,02

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Подтероб А.П. Химический состав лишайников и их медицинское применение. Химико-фармацевтический журнал. 2008; 42 (10): 32–8. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2008-42-10-32-38

2. Дембицкий В.М., Толстиков Г.А. Органические метаболиты лишайников. Новосибирск: Издательство СО РАН, Филиал «Гео»; 2005.

3. Павлова Е.С., Павлов Н.Г. Лишайники рода цетрарии *(Cetraria)* и кладонии *(Cladonia)* в экспериментальном исследовании. Материалы III Международной научной интернет-конференции: в 2 томах. Биотехнология. Взгляд в будущее, Казань, 2014: 36–42.

4. Загоскина Н.В., НиколаеваТ.Н., Лапшин П.В., Заварзин А.А., Заварзина А.Г. Водорастворимые фенольные соединения у лишайников. Микробиология. 2013; 82 (4): 434–41. https://doi.org/10.7868/S0026365613030166

5. Чахирова В.А., Верещагина В.В., Погорелов В.И. Определение содержания биологически активных веществ в сырье ягеля (оленьего мха). Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. Спецвыпуск Фармакология. 2006; 58–9.

6. Chikita F. Culberson, Hör-Dur Kristinsson. A standardized method for the identification of lichen products. Journal of chromatography, 1970; 46: 85–93.

7. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Толпышева Т.Ю. Иммуноферментный анализ усниновой кислоты в лишайниках. Прикладная биохимия и микробиология, 2013; 49 (3): 322–8. https://doi.org/10.7868/S0555109913030069

8. Прокопьев И.А., Шаварда И.Л., Филиппова Г.В., Шеин А.А. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения содержания вторичных метаболитов лишайников. Журнал аналитической химии, 2017; 72 (11): 1025–31. https://doi.org/10.7868/S004445021711007X

9. Feige G.B., Lumbsch H.T. Identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid chromatographic method. Journal of Chromatography, 1993; 646: 417–27.

References

1. Podterob A.P. Chemical compound of lichens and its medical usage. Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal. 2008; 42 (10): 32–8. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2008-42-10-32-38 (in Russian).

2. Dembitsky V.M., Tolstikov G.A. Organical metabolites of lichens. Novosibirsk: Publishing house of SiberianBranch of the Russian Academy of Sciences; 2005 (in Russian).

3. Pavlova Ye.S., Pavlov N.G. Lichens of genuscetraria *(Cetraria)* and cladonia *(Cladonia)* in an experimental study. Materials of III International scientific Internet-conference: in 2 volumes. Biotechnology. A look into the future, Kazan. 2014: 36–42 (in Russian).

4. Zagoskina N.V., Nikolaeva T.N., Lapshin P.V., Zavarzin A.A., Zavarzina A.G. Water-solublephenolic compounds of lichens. Microbiologiya. 2013; 82 (4): 434–41. https://doi.org/10.7868/S0026365613030166 (inRussian)

5. Chakhirova V.A., Vreschagina V.V., Pogorelov V.I. Determination of the content of biologically active substances in the raw material of moss (deer moss). Izvestiyavuzov. Severo-Kavkazskiy Region. Estestvennye nauki. Specvypusk Pharmacologiya. 2006; 58–9 (in Russian).

6. Chikita F. Culberson, Hör-Dur Kristinsson. A standardized method for the identification of lichen products. Journal of chromatography. 1970; 46: 85–93.

7. Burkin A.A., Kononenko G.P., Tolpysheva T.Yu. Immune assay of usnic acid in lichens. Prikladnaya biokhimiya i microbilogiya. 2013; 49 (3): 322–8. https://doi.org/10.7868/S0555109913030069 (in Russian).

8. Prokopyev I.A., Shavarda I.L., Filippova G.V., Shein A.A. The use of high performance liquid chromatography to determine the content of secondary metabolites of lichens. Zhurnal analiticheskoy khimii. 2017; 72 (11): 1025–31. https://doi.org/10.7868/S004445021711007X (in Russian).

9. Feige G.B., Lumbsch H.T. Identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid chromatographic method. Journal of Chromatography. 1993; 646: 417–27.

***Поступила** 25 апреля 2019 г.*
***Received** 25 April 2019*

***Принята к публикации** 10 декабря 2019 г.*
***Accepted** 10 December 2019*

https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-07

© Коллектив авторов, 2020
УДК 615.15:658.51

Стандартизация работы провизора-аналитика: методические подходы

С.В. Стрелков, В.А. Стрелкова, Н.Г. Золотарева

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет;

Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Стрелков Станислав Викторович – старший преподаватель кафедры управления и экономики фармации Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета. Тел.: +7 (921) 306-67-13. E-mail: stanislav.strelkov@pharminnotech.com. *ORCID0000-0002-7977-1080*

Стрелкова Вероника Андреевна – аспирант кафедры технологии лекарственных форм Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета. Тел.: +7 (951) 684-35-24. E-mail: veronica.strelkova@pharminnotech.com

Золотарева Наталья Григорьевна – доцент кафедры управления и экономики фармации Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (911) 226-32-27. E-mail: natalia.zolotareva@pharminnotech.com

РЕЗЮМЕ

Введение. Обеспечение населения эффективными, безопасными и качественными лекарственными препаратами – основная задача аптечной организации, выполнение которой определяется как функционированием системы качества организации в целом, так и непосредственной деятельностью специалистов на рабочих местах. Контроль качества лекарственных средств – один из важных элементов системы качества – состоит из последовательности действий, которые известны и полностью понятны провизору-аналитику, но его квалитативное проведение обеспечивается массивным объемом информации и точным соблюдением всех деталей анализа, поэтому важно регламентировать порядок проведения ключевых рабочих процедур, что обеспечит контроль за множеством локальных параметров, оказывающих в совокупности достаточно большое влияние на качество работы и корректность выдаваемых результатов. Работа провизора-аналитика требует систематического повышения уровня профессиональных знаний, использования современных достижений в области проведения контроля качества лекарственных средств, внедрения передового опыта и научной организации труда.

Цель исследования – анализ деятельности специалистов аптечных организаций, осуществляющих функции по контролю качества лекарственных средств и разработка методических подходов для стандартизации деятельности провизора-аналитика.

Материалы и методы. Штатное расписание 60 аптек, входящих в состав сети АО «Петербургские аптеки», изготавливающих лекарственные средства по рецепту врачей и требованиям медицинских организаций, должностные инструкции провизора-аналитика. Использован метод индивидуальной фотографии рабочего времени (ФРВ).

Результаты. В ходе исследования выявлены особенности возрастной структуры и стажа работы провизоров-аналитиков у подавляющего большинства специалистов, определена необходимость разработки особых подходов к адаптации и организации труда, с точки зрения методического обеспечения, таких работников. Определена структура рабочего дня провизора-аналитика, выявлены рабочие процессы, которые занимают большую часть оперативного времени: контроль качества экстемпоральной рецептуры, внутриаптечной заготовки, фармацевтических субстанций. Указанные виды работ составляют 84,8% от общего времени работы. Разработано 5 стандартных операционных процедур (СОП) для использования на рабочем месте провизора-аналитика. Разработано и внедрено в аптечные организации 27 алгоритмов анализа на различные лекарственные средства – внутренних нормативных документов системы качества, содержащих последовательный порядок действий по всем видам внутриаптечного контроля качества для конкретной прописи.

Заключение. На основании анализа затрат рабочего времени провизора-аналитика предложены подходы к стандартизации значимых рабочих процессов в виде документации СК – СОП, алгоритмов анализа, в которых описан оптимальный ход выполнения действий специалистов для достижения требуемого уровня качества процесса, его результативности и эффективности.

Ключевые слова: провизор-аналитик, аптечная организация, система качества, контроль качества лекарственных средств, фотография рабочего времени, стандартная операционная процедура.

Для цитирования: Стрелков С.В., Стрелкова В.А., Золотарева Н.Г. Стандартизация работы провизора-аналитика: методические подходы. Фармация, 2020; 69 (3): 50–56. *https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-07*

STANDARDIZATION OF AN ANALYTICAL PHARMACIST'S WORK: METHODOLOGICAL APPROACHES

S.V. Strelkov, V.A. Strelkova, N.G. Zolotareva

Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University; 14, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Strelkov Stanislav Viktorovich – Senior Lecturer of the Department of Management and Economics of Pharmacy, St.Petersburg State University of Chemical Pharmaceuticals. Tel.: +7 (921) 306-67-13. E-mail: stanislav.strelkov@pharminnotech.com. ***ORCID:0000-0002-7977-1080***

Strelkova Veronika Andreevna – graduate studentof the Department of Dosage Forms Technologies, St.Petersburg State University of Chemical Pharmaceuticals. Tel.: +7 (951) 684-35-24. E-mail: veronica.strelkova@pharminnotech.com

Zolotareva Natalya Grigor'evna – Associate Professor of the Department of Management and Economics of Pharmacy, St.Petersburg State University of Chemical and Pharmaceuticals, Ph.D. Tel. +7 (911) 226-32-27. E-mail: natalia.zolotareva@pharminnotech.com

SUMMARY

Introduction. Providing the population with effective, safe, and high-quality medicines is the main task of a pharmacy facility, the performance of which is determined by both the functioning of the facility as a whole and the direct activity of specialists in the workplaces.

The quality control of medicines, one of the important elements of the quality system (QS) consists of a sequence of actions that are known and fully understood by an analytical pharmacist, but its qualitative conduct is ensured by a massive amount of information and the exact observance of all the details of the analysis, so it is important to regulate the order for conducting key working procedures, which will ensure control over many local parameters that in their combination have a rather large impact on the quality of work and the correctness of yielded results. The analytical pharmacist's work requires a systematic increase in the level of professional knowledge, the use of the current advances in drug quality control, the introduction of advanced experience, and the scientific organization of labor.

Objective: to analyze the activities of pharmacy specialists who perform functions of controlling the quality of medicines and developing methodological approaches to standardizing the activities of an analytical pharmacist.

Materials and methods. The personnel arrangements of 60 pharmacies that are part of the network of AO «Petersburg Drugstores», which produce drugs on prescription and by the requirements of healthcare facilities, job descriptions of an analytical pharmacist. An individual working time photography method was used.

Results. The investigation revealed the characteristics of the age structure and service length in the vast majority of analytical pharmacists and identified the need to develop special approaches to labor adaptation and organization from the point of view of methodological support to these workers. The investigators defined the pattern of an analytical pharmacist's working day and identified working processes that took the most execution time: quality control of an extemporal formulation, intrapharmacy procurement, and pharmaceutical substances. The above types of work account for 84.8% of the total working time. Five standard operating procedures (SOPs) were developed to be used in the working place of an analytical pharmacist. A total of 27 algorithms for analyzing various drugs, such as the internal normative documents of the QS, which contain a sequential order of actions in all types of intrapharmacy quality control for a specific prescription, were developed and introduced in the pharmacy facilities.

Conclusion. An analysis of the expenditure of an analytical pharmacist's working time allowed the authors to propose approaches to standardizing significant working processes as QS documents, such as SOPs, analysis algorithms that describe the optimal sequence of the specialists' actions to achieve the required quality of the process, its effectiveness and efficiency.

Key words: analytical pharmacist; pharmacy facility; quality system; quality control of medicines; working time photography, standard operating procedure.

For reference: Strelkov S.V., Strelkova V.A., Zolotareva N.G. Standardization of an analytical pharmacist's work: methodological approaches. Farmatsiya, 2020; 69 (3): 50–56. ***https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-07***

Введение

Действующие нормативные документы отводят провизору-аналитику одну из ключевых ролей в системе качества. Приказ от 22 мая 2017 года № 427н Министерства труда и социальной защиты РФ «Об утверждении профессионального стандарта «Провизор-аналитик» устанавливает основные квалификационные требования и трудовые функции, а также определяет необходимые знания, которыми должен обладать провизор-аналитик. Однако в практической деятельности провизора-аналитика возникают многочисленные вопросы, связанные с ее формализацией, унификацией и «встройкой» в систему качества. Зачастую это обусловлено отсутствием регулирования трудовых функций таких специалистов в рамках системы качества организации, отсутствием стандартных операционных процедур и рабочих инструкций, устаревшей нормативно-правовой базой.

Цель настоящего исследования – анализ деятельности специалистов аптечных организаций, осуществляющих функции по контролю качества лекарственных средств и разработка методических подходов для стандартизации деятельности провизора-аналитика.

Материал и методы

В качестве базы исследования были выбраны аптечные организации, входящие в состав сети АО «Петербургские аптеки», сохранившие уникальный вид деятельности – изготовление лекарственных средств по рецепту врачей и требованиям медицинских организаций. В состав аптечной сети входит 86 аптечных организаций, 60 из которых осуществляют производственную функцию. При этом в год изготавливается до 800 тыс. шт. различных лекарственных форм и проводится >1 млн анализов, подтверждающих качество изго-

товленных лекарственных средств. В данном направлении АО «Петербургские аптеки» являются крупнейшей сетью не только Санкт-Петербурга, но и России. В исследовании были использованы штатное расписание аптечной сети АО «Петербургские аптеки», должностные инструкции провизора-аналитика. Всего в эксперименте было задействованы 62 специалиста.

В качестве метода исследования был использован метод индивидуальной фотографии рабочего времени (ФРВ), который дает возможность оценить потенциал и имеющиеся возможности сотрудников, определить степень мотивированности сотрудников, выявить их внутренние резервы с целью повышения эффективности труда в организации [1]. Индивидуальная ФРВ – это вид наблюдения, при котором измеряют все без исключения затраты времени исполнителя за определенное время работы. ФРВ не раскрывает технологию и методы осуществления процесса, а лишь их фиксирует. Данный метод исследования проводится с целью выявления потерь рабочего времени, установления и устранения их причины; изучения опыта исполнителей трудовых операций, показывающих наиболее высокие показатели производительности труда; разработки и установления временных нормативов обслуживания и наладки оборудования, регламентированных перерывов; получения исходных статистических данных для установления нормативов времени на определенные трудовые операции [2, 3].

ФРВ дает возможность получить уникальные результаты в области управления персоналом и его производительностью даже в условиях неполного охвата нормированием выполняемых в организации работ. Среди недостатков данного вида наблюдения можно выделить то, что для получения достоверных данных требуется высококвалифицированный специалист, обладающий специальными знаниями. Кроме того, на проведение процедуры ФРВ требуется большие временные затраты [4, 5].

Исследование проводили на двух группах сотрудников по 10 человек. В первую группу были включены провизоры-аналитики со стажем работы в должности <1 года, во вторую – от 5 до 10 лет. Период наблюдения – в течение 5 рабочих дней, продолжительность рабочего дня 8 ч (с 9:00 до 17:00) на базе 20 структурных подразделений – производственных аптечных организаций АО «Петербургские аптеки». ФРВ проводилась 2 наблюдателями, а персонал не был предупрежден о проводимом эксперименте. В основные задачи исследования входило определить структуру рабочего времени провизора-аналитика, выявить наиболее затратные операции и виды работ; определить разницу в эффективности работы в зависимости от опыта сотрудника; определить потери в рабочем времени, причины и характер их возникновения; провести сравнительный анализ труда сотрудников, которые выполняют похожие задачи, определить способ увеличения эффективности их труда.

ФРВ проводилась в 4 этапа: подготовительный, который включал инструктаж, обучение наблюдателей и составление бланков ФРВ (наблюдательных листов); собственно ФРВ, которое осуществлялось методом непосредственных замеров рабочего времени с последующим заполнением наблюдательных листов; обработка результатов исследования; анализ результатов.

Результаты и обсуждение

Анализ возрастной структуры провизоров-аналитиков АО «Петербургские аптеки» с учетом стажа работы (табл. 1) выявил, что наибольшее число работников (41%) приходится на категорию персонала в возрасте от 20 до 30 лет. Это молодые специалисты, не так давно закончившие учебное заведение и имеющие небольшой опыт работы в аптечных организациях. Наибольшее число персонала, занимающего должность провизора-аналитика, приходится на специалистов со стажем работы до 1 года и от 1 года до 5 лет, соответственно 21 и 56% (возрастные группы «от 20 до 30 лет» и «свыше 50 лет»). Таким образом, выявленные в ходе исследования особенности возрастной структуры и стажа работы провизоров-аналитиков у подавляющего большинства специалистов определили необходимость разработки особых подходов к адаптации и организации труда с точки зрения методического обеспечения таких работников.

На основе суммарных данных, полученных на II этапе ФРВ, был создан общий баланс рабочего времени для 1-й и 2-й группы провизоров-аналитиков, принимавших участие в исследовании (табл. 2).

По итогам проведения ФРВ определена структура рабочего дня провизора-аналитика, выявлены рабочие процессы, которые занимают большую часть оперативного времени: контроль качества экстемпоральной рецептуры, внутриаптечной заготовки, фармацевтических субстанций. Указанные виды работ составляют 84,8% от общего времени работы.

Установлена разница в затратах времени у сотрудников с небольшим стажем работы в должно-

сти провизора-аналитика по сравнению с более опытными сотрудниками. С наибольшими затруднениями молодые специалисты сталкиваются при проведении внутриаптечного контроля качества, т.к. отсутствует в необходимом объеме методическая литература по проведению качественного и количественного анализа по выполнению расчетов, справочные таблицы. Очень часто методики для одной прописи находятся в разных источниках, что требует дополнительных затрат времени. Неоднократно встречаются ошибки при выполнении анализа методом рефрактометрии из-за неправильной эксплуатации прибора.

Анализ затрат рабочего времени провизора-аналитика показал достаточно высокий уровень соблюдения трудовой дисциплины, нарушения правил трудовой дисциплины (НТД) имеет низкое значение – 2,1% от общего времени работы.

В ходе эксперимента выявлено отсутствие согласованности и единой последовательности в действиях провизоров-аналитиков при проведении контроля качества лекарственных средств в разных аптечных организациях сети, что может привести к увеличению ошибок в ходе его выполнения, получению недостоверных результатов, нерациональному использованию рабочего времени и пр. Минимизировать подобные риски возможно путем разработки и использования в непосредственной работе специалистов единых внутренних правил, составляющих основу документации системы качества организации.

Главная задача такой документации – создание и стабильное воспроизведение необходимых условий для проведения предупредительных мероприятий и собственно контроля качества. Поскольку большую часть персонала составляют молодые специалисты, имеющие небольшой опыт работы в должности провизора-аналитика, стандартизация работы позволит сократить и облегчить прохождение периода адаптации, за небольшой период времени сформировать определенную логику, необходимую для понимания рабочего процесса на практике. Кроме того, молодым специалистам комфортнее работать, используя документы с подробно прописанными действиями, в которых заранее установлены полномочия и ответственность за каждый рабочий процесс [6, 7].

Таблица 1

Кадровый состав провизоров-аналитиков АО «Петербургские аптеки»

Table 1

The staff of analytical pharmacists of the OA «Petersburg Drugstores»

Возраст персонала	Количество штатных единиц	Стаж работы			
		до 1 года	от 1 года до 5 лет	от 5 до 10 лет	свыше 10 лет
От 20 до 30 лет	26 (41%)	2	20	4	–
От 30 до 40 лет	10 (16%)	2	4	4	–
От 40 до 50 лет	7 (12%)	4	2	–	1
Свыше 50 лет	19 (31%)	5	9	2	3
Итого	62	13 (21%)	35 (56%)	10 (16%)	4 (7%)

Таблица 2

Общий баланс рабочего времени провизора-аналитика

Table 2

Overall working time balance in an analytical pharmacist

Виды затрат рабочего времени	Общая продолжительность, мин	Процент от общего времени наблюдения (К), %	Общее время наблюдения, мин
ПЗ – организация рабочего места и заключительные работы (подготовка к выполнению задания, поддержание средств производства в рабочем состоянии в течение смены)	33	6,9	480
ОП – оперативное время (время непосредственного выполнения заданий)	407	84,8	
ОЛН – затраты времени на отдых и личные надобности	30	6,2	
НТД – нарушения правил трудовой дисциплины (опоздания, самовольные отлучки с рабочего места, преждевременный уход с работы и др.)	10	2,1	
Итого	480	100	

С целью оптимизации документации системы качества и создания стандартных операционных процедур (СОП), необходимых для использования в работе провизора-аналитика, нами были выделены ключевые процессы, напрямую влияющие на производимый продукт (например, качество воды очищенной и воды для инъекций, так как ее использование при изготовлении лекарственных средств, для подготовки к работе, а также использование в качестве растворителя в проводимых анализах в работе провизора-аналитика напрямую влияет на качество лекарственных средств и результаты испытаний); требующие наибольших временных затрат от сотрудника; вызывающие наибольшие методические сложности при выполнении; процессы, при проведении, которых совершается наибольшее количество ошибок. В этой связи целесообразна разработка следующих СОП для использования на рабочем месте провизора-аналитика:

- Контроль качества лекарственных средств аптечного изготовления;
- Анализ воды очищенной и воды для инъекций;
- Титриметрические методы анализа;
- Рефрактометрия;
- Оборот реактивов.

Для разработанных СОП «Контроль качества лекарственных средств аптечного изготовления», «Анализ воды очищенной и воды для инъекций» и «Титриметрические методы анализа» была проведена оценка степени их использования в работе провизора-аналитика. С этой целью для каждой СОП были разработаны отдельные анкеты. Всего опрошены 62 специалиста, которые были поделены на группы в зависимости от стажа работы в должности провизора-аналитика:

- до 1 года (13 человек);
- от 1 года до 5 лет (35 человек);
- от 5 до 10 лет (10 человек);
- свыше 10 лет (4 человека).

Результаты анкетирования СОП «Контроль качества лекарственных средств аптечного изготовления» (табл. 3) показали, что к документам системы качества в течение рабочей смены обращается подавляющее большинство специалистов – 35 (57%) от общей численности провизоров-аналитиков и имеющих стаж работы в должности «до 1 года» и «от 1 года до 5 лет». Как отметили специалисты, предложенные документы являются понятными, простыми для понимания. Раздел СОП, к которому чаще всего обращаются молодые специалисты и специалисты с опытом работы, – характеристика и особенности проведения отдельных видов контроля качества лекарств.

Как правило, СОП определяют общие подходы в проведении контроля качества лекарственных средств, а детализацию условий, методов и инструментов контроля для конкретного ЛС удобно изложить в алгоритме анализа. Алгоритм анализа – это внутренний нормативный документ системы качества, содержащий последовательный порядок действий по всем видам внутриаптечного контроля качества для конкретной прописи.

С целью разработки алгоритмов анализа, нами было проведено изучение рецептуры аптечной сети АО «Петербургские аптеки», выделены наиболее часто встречающиеся прописи и разработаны соответствующие алгоритмы анализа по контролю качества

Таблица 3

Использование СОП в работе провизора-аналитика

Table 3

Use of SOP in the work of an analytical pharmacist

Оцениваемый параметр	Стаж работы в должности			
	до 1 года	от 1 года до 5 лет	от 5 до 10 лет	свыше 10 лет
Как часто Вы используете в работе СОП?				
Использую в течение смены	11	24	6	1
Использую несколько раз в неделю	2	10	4	3
Использую несколько раз в месяц	–	1	–	–
Не использую	–	–	–	–
Документ является понятым и простым для понимания?				
Да	13	35	10	4
Нет	–	–	–	–
К какому из разделов СОП Вы чаще всего обращаетесь в течение работы? (для СОП «Контроль качества лекарственных средств аптечного изготовления»)				
Предупредительные мероприятия	3	7	–	–
Виды контроля	8	23	10	4
Особенности химического контроля	2	5	–	–
Оценка качества ЛС	–	–	–	–

различных лекарственных средств. В структуру документа, описывающего алгоритм анализа, необходимо включать идентификатор (колонтитул с указанием наименования вида, названия и кода документа, номера страницы и версии документа, должности, ФИО, подписи лиц, разработавших, согласовавших и утвердивших документ дата введения в действие документа и пр.), название лекарственного препарата (ЛП) и состав на русском и латинском языках, а также контролируемые показатели – описание (внешний вид, запах, однородность смешивания, отсутствие механических включений, выборочно вкус для детских ЛФ); подлинность; общая масса ЛП/общий объем ЛП, масса отдельных доз и их количество; количественное определение; упаковка; маркировка; паспорт письменного контроля (проверка соответствия записей в паспорте письменного контроля назначениям в рецепте или требованиям, правильности произведенных расчетов). Для каждого из показателей должны быть приведены методика или метод контроля, расчеты, требования, эффекты реакций, нормы допустимых отклонений, что не требует дополнительного использования методической и нормативной документации провизором-аналитиком и значительно уменьшает время на проведение анализа.

Таблица 4

Алгоритм анализа микстуры 10% кальция хлорида 200 мл

Table 4

Algorithm for analyzing 200 ml of 10% calcium chloride mixture

Алгоритм анализа	Микстура кальция хлорида 10% 200 мл	Стр. 1 из 1	
Разработал	Код: АА-КК-03		
Согласовал	Версия 1		
Утвердил	Дата введения:		
Название	**Микстура кальция хлорида 10% 200 мл (внутриаптечная заготовка)**		
Состав	Воды очищенной стерильной 160 мл раствора кальция хлорида 50% 40 мл	*Aquae purificatae* st. 160 ml *Sol. Calcii chloridi* 50% 40 ml	
Показатели	**Методика или метод контроля/ расчет**	**Требования/эффекты реакций/ НДО**	**Вид контроля**
Описание	Визуальная оценка	Прозрачная бесцветная жидкость без запаха	Органо-лептический
Подлинность	Кальция хлорид: к 1 капле раствора препарата + 1 каплю раствора оксалата аммония 4% →	Белый осадок	Химический (качественный)
	1 капля раствора + 1 капля раствора нитрата серебра 2% →	Белый творожистый осадок	
Масса ЛП / объем ЛП / масса отдельных доз / качество укупорки		≥3 упаковок каждой серии	Физический
		V=200 мл	
		НДО: ±2%	
Количественное определение	Рефрактометрия: 1,3446–1,333/0,00116 =	НДО: ±3%	Химический (количественный)
Упаковка	Визуальная оценка	Соответствие упаковки лекарственного препарата физико-химическим свойствам, входящих в него лекарственных средств	При отпуске
Маркировка	Визуальная оценка	Соответствие маркировки требованиям приложения №1 Приказа МЗ РФ от 26.10.2015 №751н	При отпуске
Паспорт письменного контроля	Проверка расчетов и правильности заполнения	№ анализа, подпись провизора-аналитика	Письменный

Предложенная структура алгоритма анализа по контролю качества ЛП аптечного изготовления является базовой и универсальной, может быть использована в любой аптечной организации, осуществляющей изготовление лекарственных препаратов по рецептам врачей и требованиям медицинских организаций. Всего разработано и внедрено в аптечные организации 27 алгоритмов анализа на различные лекарственные средства, включая внутриаптечную заготовку, растворы перекиси водорода 3 и 6%, раствор натрия гидрокарбоната 1%, концентрированный раствора кальция хлорида 50% и часто встречающиеся экстемпоральные прописи Пример алгоритма анализа микстуры кальция хлорида 10% 200 мл представлен табл. 4.

Заключение

Изучение деятельности провизоров-аналитиков аптечной сети АО «Петербургские аптеки» позволило выявить особенности возрастной структуры и стажа работы специалистов, необходимость в разработке и реализации мероприятий системы качества аптечной организации. Отсутствие единых правил при выполнении трудовых функций может привести к получению недостоверных результатов при проведении контроля качества лекарственных средств, нерациональному использованию рабочего времени.

Стандартизация деятельности провизора-аналитика посредством разработки стандартных операционных процедур и алгоритмов анализа устанавливают единый порядок проведения контроля качества лекарственных средств, обеспечивают четкость, точность и согласованность в действиях персонала, что способствует сокращению затрат рабочего времени на проведение анализа, уменьшает количество ошибок при проведении контроля качества. Установление нормативов времени на выполнение анализа может быть использовано при формировании и оптимизации штатного расписания аптечной организации и т.д. Разработаны и внедрены в аптечные организации АО «Петербургские аптеки» 5 СОП и >30 алгоритмов анализа на различные лекарственные средства, включая внутриаптечную заготовку и часто встречающиеся экстемпоральные прописи.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Зорина А.А. Механизмы контроля использования рабочего времени специалиста. Educatio, 2015; 10 (3): 106–107.

2. Леженкина Т.И. Фотография рабочего времени – инструмент текущей оценки сотрудника. Наука. Техника. Технологии. (Политехнический вестник). 2014; 1: 79–82.

3. Афанасьева Л.А. Индивидуальная фотография рабочего времени – как метод исследования затрат рабочего времени. Сборник статей Международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы экономических отношений в постиндустриальном обществе». Уфа: Аэтерна, 2017; 1: 37–40.

4. Чучкалова Е.И., Данилина А.И. Методы изучения затрат рабочего времени служащих: сравнительный аспект. Территория науки. 2015; 2: 137–42.

5. Сидоркина С. Фотография рабочего времени: сделай сам. Справочник по управлению персоналом. 2012; 10: 86–90.

6. Стрелков С.В., Котова Н.И., Подушкин В.Ю. Формирование внутренней нормативной документации аптечной организации согласно основным принципам Системы менеджмента качества. Успехи современной науки. 2017; 5 (1): 112–6.

7. Стрелков С.В., Стрелкова В.А., Золотарева Н.Г. Программа адаптации и профессиональное развитие персонала в рамках системы менеджмента качества аптечной организации. Регистрация и разработка лекарственных средств. 2019; 8 (1): 103–7. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-103-107.

References

1. Zorina A.A. Mechanisms of control of the use of working hours of specialist. Educatio. 2015; 10 (3): 106–7 (in Russian).

2. Lezhenkina T.I. Photo of working time – the current technology employee assessment. Nauka. Tekhnika. Tekhnologii. (Politekhnicheskiy vestnik). 2014; 1: 79–82 (in Russian).

3. Afanas'eva L.A., Afanas'ev A.A. Individual photo of working time – as a method of working time research Sbornik statey Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii «Problemy i perspektivy ekonomicheskikh otnosheniy v postindustrial'nom obshchestve». Ufa: Aeterna. 2017; 1: 37–40 (in Russian).

4. Chuchkalova E.I., Danilina A.I. Methods of study of working time of employees: comparative aspect. Territoriya nauki. 2015; 2: 137–42 (in Russian).

5. Sidorkina S. Photo of working time: do it yourself. Spravochnik po upravleniyu personalom. 2012; 10: 86–90 (in Russian).

6. Strelkov S.V., Kotova N.I., Podushkin V.U. Formation of internal normative documents pharmacy organizations according to the basic principles of quality management system. Uspekhi sovremennoj nauki. 2017; 5 (1): 112–6 (in Russian).

7. Strelkov S.V., Strelkova V.A., Zolotareva N.G. The program of adaptation and professional development of personnel within a quality management system of the pharmaceutical organization. Registraciya i razrabotka lekarstvennykh sredstv. 2019; 8 (1): 103–7. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-103-107 (in Russian).

Поступила *7 октября 2019г.*
Received *7 October 2019*

Принята к публикации *16 января 2020 г.*
Accepted *16 January 2020*

Издательский дом «Русский врач» предлагает подписку на журналы

Все журналы ИД «Русский врач» решением Президиума Высшей аттестационной комиссии (ВАК) включены в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.
Журналы включены в Российский индекс научного цитирования
Более подробную информацию вы можете найти на сайте: WWW.RUSVRACH.RU

Врач (www.vrachjournal.ru)

История журнала началась более 100 лет назад. Тогда издание имело подзаголовок: «Еженедельная газета, посвященная всем отраслям медицинской науки, общественной и частной гигиене и вопросам врачебного быта». В 1988 г. по инициативе академика Е.И. Чазова на I Всесоюзном съезде врачей было принято решение о возобновлении издания. В 1990 г. вышел первый номер возрожденного журнала.

Подписной индекс по каталогу агентства «Пресса России»– полугодовой индекс — 44461, годовой индекс — 12146
по каталогу «Подписные издания» – П3011

Молекулярная медицина (www.molmedjournal.ru)

Журнал освещает результаты научных исследований в таких областях, как исследование молекулярных и генетических основ этиологии и патогенеза социально значимых заболеваний с целью разработки новых методов диагностики и способов эффективной терапии заболеваний человека, в том числе на основе технологий ядерной медицины.

Подписной индекс по каталогу «Подписные издания» — П7982

Фармация (www.pharmaciyajournal.ru)

Научно-практический журнал для провизоров и фармацевтов издается с 1952 г. Издание освещает результаты научных исследований по всем направлениям современной фармации. На страницах журнала подробно рассматриваются новые технологии, направленные на получение оригинальных препаратов, в том числе с использованием нанотехнологий, вопросы перевода экстемпоральной рецептуры в промышленное производство, результаты фармакоэкономических и фармакологических исследований.

Подписной индекс по каталогу «Подписные издания» — П6658

Медицинская сестра (www.medsestrajournal.ru)

Первый в России журнал для медсестер начал выходить в свет в 1942 г.
Журнал предоставляет уникальную информацию об отечественном и зарубежном опыте сестринского дела, знакомит с современными технологиями сестринской практики, информирует о новых направлениях в сестринской науке, образовании, международном сестринском движении.

Подписка по каталогу агентства по каталогу агентства «Пресса России» – полугодовой индекс — 44463, годовой индекс — 12147
по каталогу «Подписные издания» – П3281

Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии (www.bmpcjournal.ru)

Журнал освещает новое в науках о жизни, вклчая метаболимику, протеомику, разработки нанобиомедтехнологий живых систем; уделяет внимание разработкам современных биотест-систем, знакомит с достижениями по совершенствованию биообъектов, используемых в качестве средств производства для создания перспективных лекарственных технологий.

Подписной индекс по каталогу «Подписные издания» — П7985

Лабораторные животные для научных исследований (www.labanimalsjournal.ru)

Целью журнала является повышение качества экспериментальных исследований путем распространения передовых знаний о лабораторных животных и их использовании в научных целях. Журнал содержит публикации, включающие информацию о лабораторных животных, их благополучии, поведении, анатомии, физиологии и биохимии в норме, при патологии и в эксперименте.

ПАРАФАРМ
г. Пенза

ФЕМО-КЛИМ

НАТУРАЛЬНОЕ НЕГОРМОНАЛЬНОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ОБЛЕГЧЕНИЯ КЛИМАКТЕРИЧЕСКИХ СИМПТОМОВ

- Облегчает проявления климакса, в том числе сокращает частоту и силу приливов;
- способствует возмещению дефицита эстрогенов и тестостерона;
- способствует снижению повышенной утомляемости у женщин в менопаузе;
- стабилизирует психоэмоциональное состояние;
- снижает риск быстрого набора веса, характерный для менопаузы.

Патент на изобретение РФ № RU2577225.
Патент Евразии № EA031142.
СТР № KZ.16.01.98.003.E.000651.07.19 от 31.07.2019.

100 ЛУЧШИХ ИЗОБРЕТЕНИЙ РОССИИ

Состав:
β-аланин – 170 мг; гомогенат трутневый адсорбированный (HDBA органик комплекс) – 100 мг; глицин – 90 мг; трава клевера красного – 25 мг; корни солодки голой – 25 мг; листья шалфея лекарственного – 25 мг; пиридоксина гидрохлорид (витамин B_6) – 0,2 мг.

Телефон горячей линии 8-800-200-58-98

www.secret-dolgolet.ru feedback@secret-dolgolet.xyz

Реклама

Медаль Президента РФ · Золотой Меркурий · Золотой домкрат · Отличник качества

БАД. НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ

Реклама