

Volume 8, No. 3 2018

ISSN 1991-2919 (Print)

ISSN 2619-1172 (Online)

ВЕДОМОСТИ

НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

**THE BULLETIN OF THE SCIENTIFIC CENTRE
FOR EXPERT EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS**

www.vedomostincesmp.ru

Том 8, № 3 2018

Журнал индексируется в базе данных
«Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).
Пятилетний импакт-фактор РИНЦ — 0,413
(без самоцитирования).

К публикации принимаются статьи,
подготовленные в соответствии с правилами
для авторов, размещенными на сайте журнала
www.vedomostincesmp.ru.

Все статьи проходят рецензирование двумя
рецензентами.
Используется модель двойного слепого
рецензирования.

Плата за публикацию статьи и рецензирование
рукописи не взимается.
Ускоренная публикация не допускается.

Материалы заочных конференций не публикуются.

ВЕДОМОСТИ

НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Рецензируемый научно-практический журнал

Выходит четыре раза в год

Основан в 2005 году

Главный редактор доктор медицинских наук Ю. В. Олефир

Журнал индексируется в базе данных «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ). Архив журнала размещен в общероссийской базе научных публикаций «КиберЛенинка», научной информационной системе «Соционет», Российской государственной библиотеке, Академии Google (Google Scholar).

Москва

«Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения» — это рецензируемый научно-практический журнал, который ориентирован на разработчиков и производителей лекарственных средств, работников контрольно-разрешительной системы и государственного надзора в сфере обращения лекарственных средств, сотрудников научно-исследовательских институтов, преподавателей и студентов медицинских, фармацевтических вузов, врачей и провизоров.

К рассмотрению в журнале принимаются научные статьи, тематика которых соответствует следующим группам специальностей: 14.01.00 Клиническая медицина, 14.03.00 Медико-биологические науки, 14.04.00 Фармация.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, старший научный сотрудник,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Романов Борис Константинович, д-р мед. наук, доцент,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Аляутдин Ренад Николаевич, д-р мед. наук, проф.,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук, ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Дурнев Андрей Дмитриевич, член-корр. РАН,
д-р мед. наук, проф., НИИ фармакологии
им. В. В. Закусова (Москва, Россия)

Иванов Максим Борисович, д-р мед. наук, ФГБУН
Институт токсикологии ФМБА (Санкт-Петербург,
Россия)

Киселева Нина Михайловна, д-р биол. наук, проф.,
РНИМУ им. Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Ковалева Елена Леонардовна, д-р фарм. наук, ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук, АО
«НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (Санкт-Петербург, Россия)

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук, проф.,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Прокофьева Вера Ивановна, д-р фарм. наук, проф.,
Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Москва, Россия)

Пятигорская Наталья Валерьевна, д-р фарм. наук,
проф., Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Москва,
Россия)

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук, проф.,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва,
Россия)

Сюбаев Рашид Даутович, д-р мед. наук, ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Сычев Дмитрий Алексеевич, член-корр. РАН, д-р
мед. наук, профессор, РМАНПО (Москва, Россия)

Титова Анна Васильевна, д-р фарм. наук, ФГБУ
«ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора (Москва, Россия)

Ягудина Роза Исмаиловна, д-р фарм. наук, проф.,
Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Якушева Елена Николаевна, д-р мед. наук, проф.,
РязГМУ (Рязань, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Алешкин Владимир Андрианович, д-р биол. наук, проф.,
МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского (Москва, Россия)

Бобизода Гуломқодир Муқаммал, д-р биол. наук, д-р фарм.
наук, проф., ТГПУ им. С. Айни (Душанбе, Таджикистан)

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф.,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, проф.,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Звартау Эдвин Эдуардович, д-р мед. наук, проф.,
Первый СПбГМУ им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург,
Россия)

Кукес Владимир Григорьевич, академик РАН, д-р мед.
наук, проф., Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, ФГБУ
«НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Лепяхин Владимир Константинович, член-корр. РАН,
д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава
России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ:

Корсун Лилия Владимировна, канд. биол. наук,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР:

Молчан Нина Валерьевна, канд. фарм. наук,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф.,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва,
Россия)

Муляр Александр Георгиевич, д-р мед. наук, проф.,
МГМСУ им. А. И. Евдокимова (Москва, Россия)

Петров Владимир Иванович, академик РАН, д-р мед.
наук, проф., ВолгГМУ (Волгоград, Россия)

Свистунов Андрей Алексеевич, член-корр. РАН, д-р
мед. наук, проф., Первый МГМУ им. И. М. Сечено-
ва (Москва, Россия)

Хохлов Александр Леонидович, д-р мед. наук, проф.,
ЯГМУ (Ярославль, Россия)

Шимановский Николай Львович, член-корр. РАН,
д-р мед. наук, проф., РНИМУ им. Н. И. Пирогова
(Москва, Россия)

Яворский Александр Николаевич, д-р мед. наук,
проф., ПушГЕНИ (Пушино, Россия)

РЕДАКТОР:

Калиничев Сергей Анатольевич, канд. фарм. наук,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР ПЕРЕВОДА:

Губарева Ольга Николаевна, канд. филол. наук,
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

«The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» is a peer-reviewed scientific and practical journal which is primarily addressed to drug developers and manufacturers of medicines, control and permission system officers, state regulators in the sphere of medicinal products circulation, staff members of scientific research institutes, lecturers and students of medicine and pharmacy faculties, doctors and pharmacists.

Articles submitted for publication in the journal should pertain to one of the following specialist fields: 14.01.00 Clinical Medicine, 14.03.00 Medico-Biological Sciences, 14.04.00 Pharmacy.

EDITOR-IN-CHIEF:

Yuri V. Olefir, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate,
FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF:

Boris K. Romanov, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.,
FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD:

Renad N. Alyautdin, Dr. Sci. (Med.), Prof., FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Dmitry V. Goryachev, Dr. Sci. (Med.), FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Andrey D. Durnev, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., V. V. Zakisov Institute of Pharmacology (Moscow, Russia)

Maxim B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), «Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency (Saint Petersburg, Russia)

Nina M. Kiseleva, Dr. Sci. (Biol.), Prof., N. I. Pirogov RNRMU (Moscow, Russia)

Elena L. Kovaleva, Dr. Sci. (Pharm.), FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), JSC Scientific-Production Association «HOME OF PHARMACY», (St. Petersburg, Russia)

Alexey B. Prokofiev, Dr. Sci. (Med.), Prof., FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Vera I. Prokofieva, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I. M. Sechenov First MSMU (Moscow, Russia)

Natalia V. Pyatigorskaya, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I. M. Sechenov First MSMU (Moscow, Russia)

Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Rashid D. Syubaev, Dr. Sci. (Med.), FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Dmitry A. Sychev, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., RMACPE (Moscow, Russia)

Anna V. Titova, Dr. Sci. (Pharm.), FSBI «IMCEAAMPC» of the Roszdravnadzor (Moscow, Russia)

Roza I. Yagudina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I. M. Sechenov First MSMU, FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Elena N. Yakusheva, Dr. Sci. (Med.), Prof., RyazSMU (Ryazan, Russia)

EDITORIAL COUNCIL:

Vladimir A. Aleshkin, Dr. Sci. (Biol.), Prof., G. N. Gabrichesky MRIEM (Moscow, Russia)

Gulomkodir M. Bobizoda, Dr. Sci. (Biol.), Dr. Sci. (Pharm.), Prof., S. Ayni TSPU (Dushanbe, Tajikistan)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Natalia D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Edwin E. Zvartau, Dr. Sci. (Med.), Prof., I. P. Pavlov SPb SMU (St. Petersburg, Russia)

Vladimir G. Kukes, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., I. M. Sechenov First MSMU, FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Vladimir K. Lepakhin, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Alexander G. Mulyar, Dr. Sci. (Med.), Prof., A. I. Yevdokimov MSMSU (Moscow, Russia)

Vladimir I. Petrov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., VolgSMU (Volgograd, Russia)

Andrey A. Svistunov, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., I. M. Sechenov First MSMU (Moscow, Russia)

Alexander L. Khokhlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., YaSMU (Yaroslavl, Russia)

Nikolay L. Shimanovsky, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., N. I. Pirogov RNRMU (Moscow, Russia)

Alexander N. Yavorsky, Dr. Sci. (Med.), Prof., PushGENI (Pushchino, Russia)

EXECUTIVE EDITOR:

Lilia V. Korsun, Cand. Sci. (Biol.), FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

EDITOR:

Sergey A. Kalinichev, Cand. Sci. (Pharm.), FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

SCIENCE EDITOR:

Nina V. Molchan, Cand. Sci. (Pharm.), FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

TRANSLATION EDITOR:

Olga N. Gubareva, Cand. Sci. (Philology), FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

ВЕДОМОСТИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 8, № 3 2018

ОБЗОРЫ

- Г. Н. Енгальчева, Р. Д. Сюбаев, Д. В. Горячев, Ю. В. Олефир**
Экспертная оценка доклинических исследований первичной и вторичной фармакодинамики лекарственных средств 138
- Е. И. Саканян, Н. С. Терешина, М. Н. Лякина**
Современные аспекты стандартизации гомеопатических лекарственных препаратов 145
- Н. Е. Уварова, Н. Н. Еременко, Г. В. Раменская, Д. В. Горячев**
Планирование и оценка исследований биоэквивалентности препаратов атазанавира 151
- В. С. Кузьмин, В. В. Чернышева, А. И. Лутцева**
Рентгеновская порошковая дифрактометрия: контроль качества лекарственных средств 158
- А. С. Осипов, О. А. Попова, С. Г. Ларионова**
Анализ результатов использования amino-, амидных и нитрильных сорбентов в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий 162
- Е. И. Саканян, Е. Л. Ковалева, Л. Н. Фролова, В. В. Шелестова**
Современные требования к качеству лекарственных средств растительного происхождения 170

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- О. М. Куделина, Ю. С. Макляков, Д. П. Хлопонин, В. Г. Заика, Е. В. Ганцгорн, А. В. Сафроненко**
Сравнительная оценка эффективности фармакотерапии депрессивного расстройства методом количественной фармако-ЭЭГ 179
- И. А. Буйлова, Н. Г. Сахно, Г. М. Булгакова, О. В. Гунар**
Исключение ложных результатов микробиологического анализа лекарственных средств 187
- Ю. Б. Пурим, М. Л. Круглякова, Л. Н. Буланова, М. В. Агапкина, Л. А. Стронова, Т. Н. Боковинова, Е. П. Герникова**
Методологический подход к планированию эксперимента при выборе качественных реакций для подтверждения подлинности компонентов лекарственного средства (на примере аскорбиновой кислоты) 193

Свидетельство о регистрации средства массовой информации: ПИ № ФС77-53169 от 14 марта 2013 г.

Учредитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес редакции: 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

E-mail: vedomosti@expmed.ru

Тел.: +7 (495) 625-43-48, доб. 63-33, 63-34

Сайт: www.vedomostincsmpr.ru

Издатель: ООО «Ваше Цифровое Издательство»

Юридический адрес: 109263, Москва, ул. Шкулева, д. 9, к. 2

E-mail: isupport@neicon.ru

Сайт: http://elpub.ru

Подписано в печать: 22.08.2018

Формат 60×90/8. Печ. л. 8,75

Бумага мелованная. Печать офсетная

VEDOMOSTI NAUCHNOGO TSENTRA EKSPERTIZY SREDSTV MEDITSINSKOGO PRIMENENIYA

[The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products]

CONTENTS

Volume 8, No. 3 2018

REVIEWS

- G. N. Engalycheva, R. D. Syubaev, D. V. Goryachev, Yu. V. Olefir**
Expert Evaluation of Preclinical Studies of Primary and Secondary Pharmacodynamics of Medicines138
- E. I. Sakanyan, N. S. Tereshina, M. N. Lyakina**
Modern Aspects of Homeopathic Medicines Standardisation145
- N. E. Uvarova, N. N. Eremenko, G. V. Ramenskaya, D. V. Goryachev**
Planning and Evaluation of Bioequivalence Studies of Atazanavir Products151
- V. S. Kuzmin, V. V. Chernyshev, A. I. Luttseva**
X-ray Powder Diffraction in Quality Control of Medicines158
- A. S. Osipov, O. A. Popova, S. G. Larionova**
Analysis of the Results of Using Amino, Amide and Nitrile Sorbents
in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography162
- E. I. Sakanyan, E. L. Kovaleva, L. N. Frolova, V. V. Shelestova**
Current Requirements for the Quality of Herbal Medicinal Products170

ORIGINAL ARTICLES

- O. M. Kudelina, Yu. S. Maklyakov, D. P. Khloponin, V. G. Zaika, E. V. Gantsgorn, A. V. Safronenko**
Evaluation of the Efficacy of Depressive Disorders Pharmacotherapy Using Quantitative Pharmacology-EEG179
- I. A. Buylova, N. G. Sakhno, G. M. Bulgakova, O. V. Gunar**
Elimination of False Results of Medicines Microbiological Testing187
- Yu. B. Purim, M. L. Kruglyakova, L. N. Bulanova, M. V. Agapkina, L. A. Stronova, T. N. Bokovikova, E. P. Gernikova**
A Methodological Approach to Designing Experiments when Dealing
with Identification Tests for Medicinal Product Components (as Illustrated by Ascorbic Acid)193

Mass media registration certificate: ПИ № ФС77-53169 of
March 14, 2013

Founder: Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of
Health of the Russian Federation

Postal address: 8/2 Petrovsky Boulevard, Moscow 127051

E-mail: vedomosti@expmed.ru

Tel.: +7 (495) 625-43-48, ext. 63-33, 63-34

Website: www.vedomostinccmp.ru

Publisher: «Your Digital Publishing»

Registered office: 9/2 Shkuleva Street, Moscow
109263, Russian Federation

Tel./fax: +7 (499) 754-99-93

Website: http://elpub.ru

Passed for printing: 22 August 2018

Format 60×90/8. Conventional printed sheets: 8,75

Enamel-paper. Offset printing

© FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, 2018

Экспертная оценка доклинических исследований первичной и вторичной фармакодинамики лекарственных средств

Г. Н. Енгальчева, Р. Д. Сюбаев*, Д. В. Горячев, Ю. В. Олефир

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. Проведен сравнительный анализ национальных российских требований и нормативных документов Евразийского экономического союза (ЕАЭС), регламентирующих экспертизу доклинических фармакологических исследований. Освещены исторические аспекты формирования регуляторных требований и научно-методических рекомендаций по проведению и экспертной оценке доклинических фармакологических исследований. Согласно Правилам регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения ЕАЭС, в общий технический документ разработчик обязан включать сведения о первичной, вторичной фармакодинамике, фармакологической безопасности и фармакодинамических лекарственных взаимодействиях, которые подлежат оценке при проведении экспертизы результатов доклинических исследований. В отечественном руководстве по экспертизе отсутствует четкое указание по определению предмета экспертизы первичной и вторичной фармакодинамики, что может вызвать затруднения при формировании регистрационного досье в формате общего технического документа. Сформулированы основные подходы к экспертной оценке результатов доклинических исследований первичной и вторичной фармакодинамики лекарственных средств. Определено основное содержание экспертного анализа, включающего методологическую базу исследований, результаты исследований, характеристику профиля безопасности, экстраполяцию доклинических данных, характеристику факторов риска и прогнозируемого профиля клинической безопасности для пациентов.

Ключевые слова: лекарственные средства; первичная фармакодинамика; вторичная фармакодинамика; доклинические фармакологические исследования; экспертные критерии; интерпретация результатов исследований

Для цитирования: Енгальчева ГН, Сюбаев РД, Горячев ДВ, Олефир ЮВ. Экспертная оценка доклинических исследований первичной и вторичной фармакодинамики лекарственных средств. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):138–144. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-138-144>

***Контактное лицо:** Сюбаев Рашид Даутович; Subaev@expmed.ru

Expert Evaluation of Preclinical Studies of Primary and Secondary Pharmacodynamics of Medicines

G. N. Engalycheva, R. D. Syubaev*, D. V. Goryachev, Yu. V. Olefir

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The article dwells upon the results of comparative analysis of the Russian national requirements and EAEU regulations dealing with evaluation of preclinical pharmacological studies. It highlights historical aspects of elaboration of regulatory requirements and scientific and methodological recommendations for conducting and evaluating preclinical pharmacological studies. According to the EAEU Rules of registration and evaluation of medicinal products for human use, the Common Technical Document has to include information on primary pharmacodynamics, secondary pharmacodynamics, safety pharmacology studies, and pharmacodynamic drug interactions, which are subject to evaluation during examination of the preclinical study results. The national guideline on evaluation of medicines does not contain any clear indication of the subject of examination in primary and secondary pharmacodynamic studies, which can make it difficult to prepare a registration dossier in the format of a Common Technical Document. The article formulates basic approaches to expert evaluation of the results of preclinical studies of primary and secondary pharmacodynamics of medicines. It determines the basics of expert evaluation which covers methodological framework of the research, results of the research, characteristics of the safety profile, extrapolation of preclinical data, characteristics of risk factors and of the predictable clinical safety profile for patients.

Key words: medicinal products; primary pharmacodynamics; secondary pharmacodynamics; preclinical pharmacological studies; expert criteria; interpretation of research results

For citation: Engalycheva GN, Subaev RD, Goryachev DV, Olefir YuV. Expert evaluation of preclinical studies of primary and secondary pharmacodynamics of medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(3):138–144. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-138-144>

***Corresponding author:** Rashid D. Subaev; Subaev@expmed.ru

Внедрение современных препаратов в клиническую практику возможно только при условии детального изучения их фармакологической активности и безопасности на этапе доклинических исследований. Создание общего рынка лекарств в пространстве Евразийского экономического союза (ЕАЭС) диктует необходимость совершенствования научных и организационных аспектов доклинических исследований новых лекарственных средств, включая требования к планированию, порядку проведения, оформлению результатов и их представлению в составе регистрационного досье для проведения экспертизы с целью регистрации.

Согласно Правилам регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения ЕАЭС [1], утвержденным Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 78 от 3 ноября 2016 г. (далее — Решение № 78), в общий технический документ разработчик обязан включать сведения о первичной, вторичной фармакодинамике, фармакологической безопасности и фармакодинамических лекарственных взаимодействиях, которые подлежат оценке при проведении экспертизы результатов доклинических исследований. Подходы к проведению исследований фармакологической безопасности и экспертной оценке полученных результатов представлены в предыдущих работах [2, 3]. Необходимо отметить, что в отечественном «Руководстве по экспертизе лекарственных средств» отсутствует четкое указание по определению предмета экспертизы первичной и вторичной фармакодинамики, что может вызвать затруднения при формировании регистрационного досье в формате общего технического документа [4, 5].

Цель работы — обосновать необходимость проведения исследований первичной и вторичной фармакодинамики, определить стандарты качества данных исследований, установить критерии их экспертной оценки.

В нашей стране при разработке лекарственных препаратов традиционно исследуют их специфическую фармакологическую активность, а для оценки нежелательных эффектов изучают общую фармакологическую активность, влияние на сердечно-сосудистую, центральную нервную систему и дыхание [6].

Аналогичные подходы практиковались при проведении фармакологических исследований в странах, входящих в Международный совет по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для применения у человека (The International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use — ICH) до 1995 года (табл. 1).

Согласно рекомендациям, перечисленным в таблице 1, наряду с установлением основных фармакодинамических эффектов, обеспечивающих терапевтическую эффективность лекарственных средств, большое значение придается оценке влияния разрабатываемого препарата на жизненно важные функции, выявлению дополнительных фармакодинамических эффектов, т.е. проведению общепармакологических исследований. Наиболее детальные рекомендации по экспериментальному выявлению неблагоприятных эффектов были изложены в японском руководстве. Согласно ему, исследования общей фармакологии включают исследования, спланированные для выявления нежелательных явлений со стороны организма и расширения сведений о фармакологических свойствах лекарственного препарата. Однако на тот момент не было принято международного определения терминов «первичная фармакодинамика», «вторичная фармакодинамика» и «фармакологическая безопасность». Поэтому в регионе ICH были предприняты шаги для гармонизации терминологии, относящейся к доклиническим фармакологическим исследованиям. Результатом стало создание руководства ICH S7 [8]. В примечании 1 к данному руководству

Таблица 1. Сравнение зарубежных руководств по проведению фармакологических исследований (до 1995 года) [7]

Table 1. Comparison of foreign guidelines on pharmacological studies (before 1995) [7]

Германия	Европейский союз	США	Япония
Allgemeine Verwaltungsvorschrift zur Anwendung der Arzneimittelpflichtrichtlinien (Bundsrat Drucksache 580/89; 3. Abschnitt, C. 1; Okt. 1989) Фармакодинамика - определить спектр действия вещества - предполагаемые желаемые эффекты - воздействие на жизненно важные функции («общая фармакология») - определение зависимости доза — эффект для желательных и нежелательных эффектов	Notice to Applicants (Part III f; Jan. 1989) Фармакодинамика «Исследования, проводимые для установления фармакодинамических эффектов и действия, должны оцениваться в следующем порядке»: - исследования, демонстрирующие желаемые терапевтические эффекты («специфическая фармакодинамика») - исследования, демонстрирующие эффекты в дополнение к желаемым эффектам («общая фармакология») - исследования для выявления взаимодействия лекарственных средств	Guidelines for the Format and Content of the Nonclinical Pharmacology / Toxicology Section of an Application (FDA; Feb. 1987) Part II. D. 1. «Фармакологические исследования должны быть представлены в следующем порядке, с определением ED₅₀ в дозозависимых исследованиях, предшествующих механизму исследований действия»: - эффекты, связанные с терапевтическим показанием (первичная и вторичная активность) - эффекты, связанные с возможными неблагоприятными реакциями - межлекарственное взаимодействие	Guidelines for General Pharmacology Studies (MHW 1995) - общие эффекты и поведение - влияние на ЦНС - влияние на автономную нервную систему и гладкую мускулатуру - влияние на дыхательную и сердечно-сосудистую систему - влияние на пищеварительную систему - влияние на водно-электролитный баланс - прочие важные фармакодинамические эффекты - специальные дополнительные тесты

отмечено: «Исследования общей фармакологии считаются важным компонентом при изучении безопасности лекарственных препаратов. К исследованиям общей фармакологии изначально относили исследования, направленные на изучение эффектов исследуемого лекарственного препарата, не являющихся первичными фармакодинамическими» [9].

Таким образом, понятия первичная и вторичная фармакодинамика официально введены в 2000 году в руководстве ICH S7, посвященном доклиническим исследованиям фармакологической безопасности. С этого времени в регионах ICH сведения об изучении первичной и вторичной фармакодинамики разработчики включают в самостоятельные разделы досье на лекарственный препарат. Схема механизма действия лекарственного препарата как результат воздействия на первичные и вторичные мишени представлена на рисунке 1.

Действие лекарственных средств или их активных метаболитов на организм представляет собой результат неспецифических взаимодействий с субстратами организма и специфических взаимодействий с первичными и вторичными мишенями, которые приводят к развитию желаемого терапевтического эффекта, первичных и вторичных побочных эффектов.

Первичная фармакодинамика — это не что иное, как доклинические исследования специфической фармакологической активности и механизма основного фармакологического действия, обеспечивающего терапевтическую эффективность лекарственного средства.

Исследования первичной фармакодинамики составляют основу доклинического подтверждения потенциальной эффективности по заявленным показаниям, особенности действия или ожидаемых преимуществ перед существующими аналогами препарата по действию. Исследования первичной фармакодинамики (специфической фармакологической активности) традиционно соответствуют делению лекарственных средств на фармакотерапевтические группы и, как правило, включают общепризнанные валидированные методы с использованием релевантных тест-систем и моделей, которые подробно описаны в соответствующих методических рекомендациях и руководствах по доклиническим фармакологическим исследованиям. Так, Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств [6] в разделе 2 «Доклинические исследования эффективности лекарственных средств» содержит методические рекомендации по доклиническому изучению, в том числе анальгетической, противосудорожной, нейролептической, местноанестезирующей, гипотензивной активности, транквилизирующего действия и др.

Методологические подходы к изучению первичной фармакодинамики в настоящее время разнообразны, что обусловлено специфичностью действия отдельных групп лекарственных средств, а также прогрессом специальных исследований и разработкой лекарственных средств с принципиально новыми механизмами действия. Современная методологическая база доклинических исследований включает набор традиционных фармакологиче-

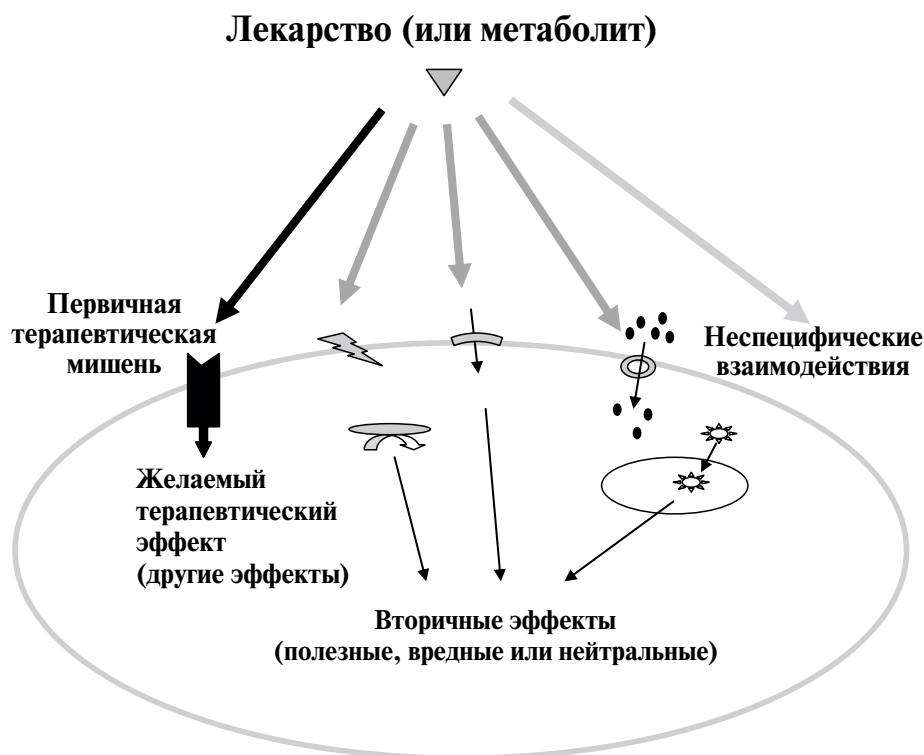


Рис. 1. Механизм действия лекарственного препарата (или активного метаболита) как результат воздействия на первичные и вторичные мишени [10]

Fig. 1. The mechanism of action of a medicinal product (or active metabolite) as a result of its effect on primary and secondary targets [10]

ских методов и моделей на лабораторных животных *in vivo*, а также методы *in vitro*, позволяющие определить возможный механизм и мишени фармакологического действия (в том числе связывание с рецепторами, влияние на активность целевых ферментных систем, ионный транспорт и др.).

Доклинические фармакологические исследования потенциальной терапевтической эффективности (пользы), в отличие от токсикологических исследований потенциальной безопасности (риска), строго не регламентируются, и, как правило, к ним не применяются требования надлежащей лабораторной практики (GLP). Исключение составляют исследования фармакологической безопасности с оценкой риска воздействия препарата на жизненно важные функции организма, которые проводятся по правилам GLP.

Вторичная фармакодинамика — это результат относительной избирательности действия лекарственных средств, которая характеризует их способность воздействовать на чувствительные мишени, не связанные с реализацией терапевтического фармакологического эффекта. Воздействие лекарственных средств на эти дополнительные мишени приводит к развитию вторичных побочных эффектов, которые могут быть полезными, вредными или нейтральными.

Программа изучения вторичной фармакодинамики в зависимости от стадии доклинической разработки и степени обоснованности строго не регламентируется и может значительно варьировать по содержанию и объему. В общем виде исследования вторичной фармакодинамики могут включать как скрининговые исследования по определению вторичных мишеней связывания *in vitro*, так и основные тесты и модели специфической фармакологической активности *in vivo*.

В нашей стране определение терминов «первичная фармакодинамика» и «вторичная фармакодинамика» (табл. 2) впервые дано в Руководстве по экспертизе лекарственных средств [4]. В 2016 году введен ГОСТ Р 56700-2015 [9], идентичный международному документу ICH S7A, в котором также содержится определение этих терминов.

Таблица 2. Классификация фармакологических исследований*

Table 2. Classification of pharmacological studies*

Первичные фармакодинамические	Изучение механизма действия и эффектов действующего вещества в отношении его целевой терапевтической мишени
Вторичные фармакодинамические	Изучение механизма действия и эффектов вещества, не связанных с его целевой терапевтической мишенью
Фармакологические исследования безопасности	Исследования, направленные на изучение потенциальных нежелательных фармакодинамических эффектов активного действующего вещества со стороны физиологических функций в дозах, соответствующих терапевтическому диапазону и выше

* Соответствует ICHS7A и ГОСТ Р 56700-2015.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ПРОВЕДЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В скрининговых исследованиях определяют наличие фармакологической активности у исследуемых веществ для определения целесообразности их дальнейшего изучения в качестве потенциальных лекарственных средств. Использование методов оценки первичной фармакодинамики предполагает применение простых, легко воспроизводимых и экономичных методов *in vitro* и *in vivo*. Интерпретация результатов по одной серии экспериментов имеет ориентировочный характер, при этом прогноз фармакологической активности возможен при наличии достоверного и дозозависимого эффекта. Оценка острой токсичности на данном этапе необходима, чтобы определить адекватные дозы для последующих фармакологических экспериментов, поэтому допускается использование альтернативных методов введения изучаемого вещества экспериментальным животным (например, внутрибрюшинно, а не внутривенно). После завершения этапа поиска необходимо проанализировать полученные результаты, отобрать наиболее перспективные соединения, определить диапазон доз, способ и схему применения отобранных соединений на следующем этапе исследования.

Следующий этап исследования — это углубленное изучение активности. Целью данного этапа является оценка специфической фармакологической активности и широты терапевтического действия отобранного соединения. Прежде всего на данном этапе необходимо определить показатели специфической активности ($ЭД_{50}$ — средне-эффективные дозы, вызывающие определенный фармакологический эффект у 50 % животных). Далее необходимо проведение серий сравнительных экспериментов с позитивным контролем, в качестве которого используют стандартные препараты, применяемые в адекватной (эквитоксической) дозе. Также на этом этапе определяют широту терапевтического действия исследуемого соединения. Широта терапевтического действия оценивается по терапевтическому индексу. Терапевтический индекс — это условный показатель, представляющий собой отношение средней смертельной дозы ($ЛД_{50}$) к дозе, вызывающей регистрируемый фармакологический эффект ($ЭД_{50}$, характеризующей, например, снижение артериального давления, уменьшение воспалительной реакции и т.д. у 50 % экспериментальных животных).

Дополнительные исследования позволяют расширить представления о фармакологическом спектре разрабатываемого препарата за счет использования специальных методов оценки специфической активности. На данном этапе изучают активность нового препарата при лечебной схеме применения, используя экспериментальные модели заболеваний. Для оценки специфического фармакологического действия лекарственных форм проводят наиболее показательные сравнительные эксперименты с применением рекомендуемых способов введения.

Изучение механизмов действия лекарственного препарата предполагает использование принципов фармакологического анализа, а также биохимических и других специальных методов, позволяющих оценить выраженность типичного для большинства современных препаратов механизма действия или выявить иные механизмы действия.

Фармакологические исследования проводят в сравнении с эталонными средствами, выбираемыми в зависимости от происхождения, химического строения и предполагаемого механизма действия нового соединения. Целесообразно также проводить сравнение с отрицательным контролем. Важность проведения сравнительных исследований фармакологической активности нашла отражение в требованиях ЕАЭС к документам регистрационного досье. Так, Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения (приложение 1) указывают, что результаты фармакологических исследований должны сопоставляться с данными, характеризующими вещество или вещества с аналогичным терапевтическим действием. Отсутствие сравнительных исследований должно быть обоснованным [1].

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРТИЗЫ ПЕРВИЧНОЙ И ВТОРИЧНОЙ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Форма экспертного отчета, регламентируемого Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 558н от 24 августа 2017 г. [11], не содержит требований к оценке первичной и вторичной фармакодинамики при проведении экспертизы отношения ожидаемой пользы к возмож-

ному риску применения лекарственного препарата. Однако форма экспертного отчета при проведении экспертизы документов для получения разрешения на проведение клинического исследования лекарственного препарата предусматривает, среди прочего, оценку основных фармакодинамических (иммунологических) эффектов и фармакодинамических эффектов, не связанных с заявленным показанием к применению, иными словами, результатов первичных и вторичных фармакодинамических исследований.

Форма экспертного отчета по оценке результатов доклинических (неклинических) исследований, утвержденная Решением № 78 (приложение 1), предусматривает необходимость экспертной оценки первичной и вторичной фармакодинамики [1].

Необходимо отметить, что согласно современным международным рекомендациям в соответствии с правилами GLP проводят доклинические исследования, направленные на изучение именно безопасности лекарственного препарата (табл. 3).

При проведении экспертизы фармакологических исследований необходимо учитывать, что полностью освобождены от соблюдения требований GLP только исследования первичной фармакодинамики, которые рекомендуется проводить в соответствии с рекомендациями ВОЗ «Quality practices in basic biomedical research» [12]. Изучение вторичной фармакодинамики рекомендуется проводить в соответствии с правилами GLP в том случае, если данный вид исследований важен для оценки безопасности препарата.

Таблица 3. Сравнение стандартов качества доклинических исследований лекарственных препаратов [12]

Table 3. Comparison of quality standards for conducting preclinical studies of medicines [12]

Стандарт для проведения исследований	Задачи исследования	Методы или вид исследования	Этап исследований
Quality practices in basic biomedical research (QPBR) — Качественные практики базовых биомедицинских исследований	Выявить активность субстанции (<i>per se</i>)	Аналитические Скрининговые	1a
	Охарактеризовать активное соединение	Исследования <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	1b
	Доказательство активности	Фармакокинетические исследования Рецепторное связывание Модели патологии и др.	1c
Good laboratory practice (GLP)	Оценка безопасности	Общетоксическое действие Специфические виды токсичности Токсикокинетика Фармакологическая безопасность Местная переносимость и пр.	2

Таблица 4. Определение приемлемости доклинических фармакологических исследований [12]

Table 4. Determination of acceptability of preclinical pharmacological studies [12]

Возможные варианты	Научная обоснованность гипотезы	Качественно проведенные исследования	Приемлемость полученных результатов
Исследование 1	нет	нет	нет
Исследование 2	нет	да	нет
Исследование 3	да	нет	нет
Исследование 4	да	да	да

Согласно регуляторной классификации (табл. 2) первичное фармакодинамическое исследование подразумевает изучение действующего вещества в отношении основного (целевого) заболевания исходя из предполагаемых показаний к применению. Поэтому при экспертизе необходимо, прежде всего, оценить концепцию, которая лежит в основе разработки препарата. Признать приемлемость результатов можно только в том случае, если подтверждается научная обоснованность гипотезы, лежащей в основе разработки, а сами исследования были проведены качественно (табл. 4).

Экспертная оценка и выводы по представленным документам об изучении первичной фармакодинамики нового лекарственного средства включают подтверждение:

- концепции разработки (*in vitro* и *in vivo*) и механизма действия препарата;
- адекватности использованных животных моделей: соответствие предлагаемым показаниям к применению и пригодность для межвидового анализа;
- фармакологической активности (например, ЭД₅₀), в том числе для тех видов животных, которые были также использованы при проведении токсикологических исследований;
- преимущества нового препарата по сравнению с известными лекарственными средствами (например, по эффективности и безопасности, широте терапевтического действия);
- продолжительности (обратимости) фармакологических эффектов;
- профиля резистентности (для противомикробных препаратов);
- наличия фармакологически активных метаболитов и их вклада в фармакодинамические эффекты;
- прочее (в зависимости от экспертной задачи).

Как показывает опыт проведения экспертизы, в настоящее время для оценки вторичной фармакодинамики зарубежные разработчики лекарственных средств, как правило, проводят исследования *in vitro*, чтобы показать, что препарат не обладает активностью в отношении определенных ферментов, рецепторов, ионных каналов, транспортеров, функций различных тканей. На основании этих исследований делают вывод о селективности разрабатываемого препарата. Отечественные исследователи подобные тесты проводят достаточно редко и ограничиваются исследованиями общей фармакологии. При проведении экспертизы результатов изучения вторичной фармакодинамики на основании исследований связывания *in vitro* необходимо учитывать ограничения данного метода. Это вызвано тем, что количество известных ассоциаций между конкретными белками и нежелательными эффектами ограничено; многие данные, полученные фармацевтическими компаниями, не являются общедоступными; метод не позволяет проводить оценку общего эффекта при действии на множество мишеней [13]. В этой связи прогноз о селективности препарата носит вероятностный характер.

Полноценная характеристика фармакологического профиля лекарственного средства требуется

не только для оценки пользы и риска на этапе клинических исследований и составления инструкции по медицинскому применению препарата, но также для анализа нежелательных реакций, регистрируемых в дальнейшем системой фармаконадзора при его медицинском применении [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение первичной и вторичной фармакодинамики является неотъемлемой частью программы доклинических исследований лекарственных препаратов. Современные требования устанавливают необходимость включения полученных результатов в регистрационное досье.

Разработчику рекомендуется указывать стандарты качества проведения данных исследований. При экспертной оценке проведенных исследований используются критерии, учитывающие группу, к которой относится препарат, и конкретные условия его применения.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia and was carried out as part of a publicly funded research project (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». [Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission, November 3, 2016, No. 78 «On rules of registration and evaluation of medicinal products for human use» (In Russ.)]
2. Енгальчева ГН, Сюбаев РД, Васильев АН, Снегирева АА, Верстакова ОЛ. Оценка фармакологической безопасности лекарственных средств в доклинических исследованиях. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(1):10–3. [Engalycheva GN, Syubaev RD, Vasiliev AN, Snegireva AA, Verstakova OL. Preclinical safety pharmacology evaluation of medicinal products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;(1):10–3 (In Russ.)]
3. Енгальчева ГН, Сюбаев РД, Горячев ДВ. Исследования фармакологической безопасности лекарственных средств: экспертная оценка полученных результатов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;7(2):92–7. [Engalycheva GN, Syubaev RD, Goryachev DV. Safety pharmacology studies of medicinal products: evaluation of results. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(2):92–7 (In Russ.)]
4. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013. [Guidance on evaluation of medicines. V. I. Moscow: Grif i K; 2013 (In Russ.)]
5. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Чапленко АА, Меркулов ВА. Дизайн доклинических исследований биомедицинских клеточ-

- ных продуктов: особенности, ключевые принципы и требования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(3):133–44. [Melnikova EV, Merkulova OV, Chaplenko AA, Merkulov VA. Design of preclinical studies of biomedical cell products: characteristics, key principles and requirements. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(3):133–44 (In Russ.)]
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. М.: Гриф и К; 2012. [Guidance on pre-clinical studies of medicines. Part I. Moscow: Grif i K; 2012 (In Russ.)]
 7. Vogel HG, ed. *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays*. Berlin: Springer-Verlag; 2006.
 8. Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals (S7A) 2000. Available from: <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>
 9. ГОСТ Р 56700-2015. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности. М.: Стандартинформ; 2016. [State Standard R 56700-2015. Medicines for medical applications. Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. Moscow: Standartinform; 2016 (In Russ.)]
 10. Valentin J-P, Hammond T. Safety and secondary pharmacology: successes, threats, challenges and opportunities. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2008;58(2):77–87. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2008.05.007>
 11. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 августа 2017 г. № 558н «Об утверждении Правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и особенности экспертизы отдельных видов лекарственных препаратов для медицинского применения (референтных лекарственных препаратов, воспроизведенных лекарственных препаратов, биологических лекарственных препаратов, биоаналоговых (биоподобных) лекарственных препаратов (биоаналогов), гомеопатических лекарственных препаратов, лекарственных растительных препаратов, комбинаций лекарственных препаратов), форм заключений комиссии экспертов». [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation, August 24, 2017, No. 558n «On approval of the rules for the examination of medicinal products for medical use and the particular expertise of certain types of medicinal products for medical use (reference drugs) of medicinal products (biosimilars), homeopathic medicines, medicinal plants reparations, combinations of drugs), the forms of the conclusions of the commission of experts» (In Russ.)]
 12. World Health Organization. Quality practices in basic biomedical research. Training manual. 2010.
 13. Иванов СМ. Компьютерная оценка механизмов побочного действия лекарственных веществ на сердечно-сосудистую систему: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.; 2014. [Ivanov SM. In silico assessment of the mechanisms of the side effects of drugs on the cardiovascular system. Cand. Biol. Sci. [thesis]. Moscow; 2014 (In Russ.)]
 14. Романов БК, Аляутдин РН, Глаголев СВ, Поливанов ВА. Типовой мастер-файл системы фармаконадзора (МФСФ). *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2016;(2):11–27. [Romanov BK, Alyautdin RN, Glagolev SV, Polivanov VA. Typical pharmacovigilance system master file (PSMF). *Bezopasnost i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2016;(2):11–27 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ

Енгальчева Галина Нинелевна, канд. биол. наук, главный эксперт управления № 2 по эффективности и безопасности лекарственных средств Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5121-0858>

Сюбаев Рашид Даутович, д-р мед. наук, заместитель начальника управления № 2 по эффективности и безопасности лекарственных средств Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6729-2349>

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук, директор Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, генеральный директор ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

AUTHORS

Galina N. Engalycheva, Cand. Sci. (Biol.), Chief Expert of Division No. 2 on Medicinal Products' Safety and Efficacy of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5121-0858>

Rashid D. Subaev, Dr. Sci. (Med.), Deputy Head of Division No. 2 on Medicinal Products' Safety and Efficacy of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6729-2349>

Dmitry V. Goryachev, Dr. Sci. (Med.), Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Yuri V. Olefir, Dr. Sci. (Med.), General Director of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Статья поступила 18.04.2018
Принята к печати 22.08.2018

Article was received 18 April 2018
Accepted for publication 22 August 2018

Современные аспекты стандартизации гомеопатических лекарственных препаратов

Е. И. Саканян, Н. С. Терешина*, М. Н. Лякина

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. Охарактеризовано состояние стандартизации гомеопатических лекарственных средств в ведущих зарубежных фармакопеях. Рассмотрены основные требования к сырью растительного, животного и минерального происхождения, используемого для получения гомеопатических лекарственных средств. Разработаны требования к гомеопатическим фармацевтическим субстанциям, в том числе технологии получения настоек гомеопатических маточных, гомеопатических разведений, тритураций и др., моно- и многокомпонентных гомеопатических препаратов, а также методы контроля качества гомеопатических субстанций и гомеопатических лекарственных препаратов. Приведен анализ номенклатуры гомеопатического сырья и гомеопатических фармацевтических субстанций по ведущим зарубежным фармакопеям. Выработаны требования, предъявляемые к гомеопатическим лекарственным формам: «Гранулы гомеопатические», «Капли глазные гомеопатические», «Мази гомеопатические», «Настои и отвары гомеопатические», «Настойки гомеопатические маточные», «Растворы для инъекций гомеопатические», «Растворы и жидкие разведения гомеопатические», «Сиропа гомеопатические», «Смеси гомеопатические», «Суппозитории гомеопатические», «Таблетки гомеопатические», «Тритурации гомеопатические». Показана перспективность использования методов вибрационной и рамановской спектроскопии для выявления отличительных особенностей гомеопатических препаратов при сверхвысоком разведении. Разработана методология построения фармакопейных стандартов на сырье для производства фармацевтических субстанций, фармацевтические субстанции, используемые для получения гомеопатических лекарственных препаратов, и лекарственные формы, включающие особенности технологии и стандартизации гомеопатических лекарственных средств, реализованные при подготовке проектов фармакопейных статей для Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Ключевые слова: стандартизация; гомеопатические фармацевтические субстанции; гомеопатические лекарственные препараты; фармакопейные статьи; общие фармакопейные статьи; контроль качества

Для цитирования: Саканян ЕИ, Терешина НС, Лякина МН. Современные аспекты стандартизации гомеопатических лекарственных препаратов. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):145–150. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-145-150>

***Контактное лицо:** Терешина Наталья Сергеевна; tereshina@expmed.ru

Modern Aspects of Homeopathic Medicines Standardisation

E. I. Sakanyan, N. S. Tereshina*, M. N. Lyakina

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The article describes the status of homeopathic medicines standardisation in the leading world pharmacopoeias. It reviews main requirements for raw materials of plant, animal, and mineral origin, which are used in the production of homeopathic medicines. It also considers requirements for homeopathic pharmaceutical substances, including technologies of obtaining homeopathic mother tinctures, homeopathic dilutions, triturations, etc., mono- and multi-component homeopathic medicines, as well as quality control of homeopathic substances and homeopathic medicines. The article analyses the nomenclature of homeopathic raw materials and homeopathic substances used by the leading world pharmacopoeias. It dwells upon the results of work devoted to the development of requirements for the following homeopathic dosage forms: homeopathic granules, homeopathic eye drops, homeopathic ointments, homeopathic infusions and decoctions, homeopathic mother tinctures, homeopathic solutions for injection, homeopathic solutions and liquid dilutions, homeopathic syrups, homeopathic mixtures, homeopathic suppositories, homeopathic tablets, homeopathic triturations. The article illustrates significant potential of using vibrational spectroscopy and Raman spectroscopy for the detection of distinctive features of homeopathic medicines at ultra-high dilutions. The article presents methodology for structuring pharmacopoeial standards for raw materials used in the production of pharmaceutical substances, for pharmaceutical substances that are used in homeopathic medicines, and for dosage forms, including specific aspects of production and standardisation of homeopathic medicines, which was implemented during preparation of draft monographs for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Key words: standardisation; homeopathic substances; homeopathic medicines; monographs; general chapters; quality control

For citation: Sakanyan EI, Tereshina NS, Lyakina MN. Modern aspects of homeopathic medicines standardisation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(3):145–150. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-145-150>

***Corresponding author:** Natalia S. Tereshina; tereshina@expmed.ru

Одним из направлений современной медицины является гомеопатия, которая официально признана в ряде стран Европы и Азии, в том числе в России, Северной и Южной Америке, ряде стран Африки [1]. В некоторых странах имеются национальные гомеопатические фармакопеи, в том числе в Германии, Великобритании, США, Индии, Бразилии; в ряде стран — национальные фармакопеи: Франции, Великобритании, а также региональная фармакопея: Европейская фармакопея (Ph. Eur.), которые содержат разделы по гомеопатическим лекарственным средствам. Монографии этих фармакопей содержат требования к качеству гомеопатических субстанций, методы получения субстанций и лекарственных препаратов в различных лекарственных формах [2–8].

Согласно действующему российскому законодательству «гомеопатический лекарственный препарат — лекарственный препарат, произведенный или изготовленный из фармацевтической субстанции или фармацевтических субстанций в соответствии с требованиями общих фармакопейных статей к гомеопатическим лекарственным препаратам...» [9]. Однако до настоящего времени Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) не содержала общих фармакопейных и фармакопейных статей, регламентирующих качество гомеопатических лекарственных средств (ГомЛС). В связи с этим актуальной является разработка научных основ стандартизации гомеопатических лекарственных средств, в том числе создание фармакопейных стандартов на гомеопатические препараты для Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ XIV). Это позволит гарантировать высокое качество ГомЛС, обеспеченное эффективной системой контроля их производства и/или изготовления.

Цель работы — разработка современных требований к стандартизации гомеопатических лекарственных средств, в том числе методологии построения фармакопейных стандартов на сырье растительного, минерального и животного происхождения, используемого для производства фармацевтических субстанций, а также на фармацевтические субстанции для гомеопатических лекарственных препаратов и лекарственные формы, включающих особенности их технологии и стандартизации.

Стандартизация гомеопатических лекарственных препаратов (ГомЛП) базируется на:

- стандартизации гомеопатических фармацевтических субстанций;
- использовании стандартной технологии получения гомеопатических фармацевтических субстанций, а также моно- и многокомпонентных гомеопатических препаратов;
- учете сведений о фармацевтической субстанции и особенностях используемой технологии при стандартизации ГомЛП.

За период 2015–2017 гг. были разработаны и представлены к рассмотрению на Совете Министерства здравоохранения Российской Федерации по Государственной фармакопее 20 проектов общих фармакопейных статей (ОФС) на лекарственные

формы (ЛФ) и около 50 проектов фармакопейных статей (ФС), регламентирующих качество ГомЛС (в том числе «Настойки гомеопатические матричные»). При этом гомеопатические лекарственные препараты могут быть произведены в таких традиционных ЛФ (таблетки, капли и др.), которые наиболее часто используются при производстве ЛП аллопатической медицины.

В число проектов ОФС включены как актуализированные статьи, действовавшие до 2018 г. на территории Российской Федерации, так и вновь разработанные. К ранее действующим ОФС относятся: «Гранулы гомеопатические», «Капли глазные гомеопатические», «Мази гомеопатические», «Настои и отвары гомеопатические», «Настойки гомеопатические матричные», «Растворы для инъекций гомеопатические», «Растворы и жидкие разведения гомеопатические», «Сиропа гомеопатические», «Смеси гомеопатические», «Суппозитории гомеопатические», «Таблетки гомеопатические», «Тритурации гомеопатические» [10]. Впервые предложена к введению в практику отечественного фармакопейного анализа ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов», которая содержит основные термины и определения («гомеопатическая фармацевтическая субстанция», «гомеопатическое лекарственное средство», «гомеопатический лекарственный препарат»), а также классификацию и перечень ЛФ. Кроме того, в номенклатуре ЛФ имеются специфичные для гомеопатических ЛП лекарственные формы, к которым относятся: гранулы (пилюли) импрегнированные гомеопатические, оподельдоки гомеопатические, разведения гомеопатические и смеси гомеопатические, настои и отвары гомеопатические.

Наименования лекарственных форм ГомЛП, включенные в проекты соответствующих ОФС, утверждены Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 538н от 27 июля 2016 г. «Об утверждении перечня наименований лекарственных форм лекарственных препаратов для медицинского применения» [11].

Наиболее распространенной в России лекарственной формой ГомЛС являются гранулы гомеопатические, которые представляют собой твердую дозированную лекарственную форму для внутреннего применения. Гранулы гомеопатические производят/изготавливают несколькими способами: нанесением гомеопатических разведений на гранулы, насаиванием на сахарные гранулы гомеопатических разведений в сахарном сиропе и грануляцией в «псевдооживленном» слое растворов лактозы с использованием гомеопатических разведений, настоек гомеопатических матричных и тритураций.

Одной из традиционных лекарственных форм, применяемых в гомеопатии, являются тритурации гомеопатические. Это твердая лекарственная форма в виде порошка, состоящая из одного или нескольких измельченных веществ или их разведений со вспомогательным веществом и предназначенная для приема внутрь или для производства/изготовления других ЛФ. Чаще всего в гомеопатии

тритурации используют для приготовления жидких разведений из нерастворимых соединений (соли, металлы, минералы и др.).

Перспективной и наиболее удобной формой для приема больными ГомЛП являются таблетки. Эта ЛФ не только обеспечивает адресную (желудок или кишечник) доставку активного вещества организму, но и обладает рядом преимуществ в плане транспортирования, хранения препаратов и др. Подготовлен проект новой ОФС «Таблетки гомеопатические», который гармонизирован с ведущими зарубежными фармакопеями.

Из мягких лекарственных форм в гомеопатической практике широко применяются мази, опodelьдоки, суппозитории, гели.

Впервые разработаны проекты ОФС, регламентирующие основные требования к качеству сырья растительного, животного, минерального и химического происхождения, используемого в производстве/изготовлении гомеопатических фармацевтических субстанций. Эти требования нашли отражение в проектах следующих ОФС, подготовленных для включения в ГФ РФ: «Лекарственное растительное сырье для гомеопатических лекарственных препаратов», «Сырье животного происхождения для гомеопатических препаратов», «Сырье минерального и химического происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов». Во вводной части этих ОФС приводятся виды сырья, на которые распространяются требования указанных фармакопейных стандартов.

Лекарственное растительное сырье (ЛРС) для ГомЛП включает, наряду с цельными или измельченными растениями, надземные, подземные органы растений или их отдельные части. Кроме того, к ЛРС, используемому в гомеопатической

практике, относятся водоросли, грибы, спорынья и лишайники, часто в необработанном состоянии, а также определенные выделения (экссудаты) растений, которые не подвергались предварительной специальной обработке. ЛРС используется в гомеопатии в свежем, реже высушенном состоянии. Требования, предъявляемые к высушенному ЛРС, используемому для производства ГомЛП, совпадают с таковыми, предъявляемыми к ЛРС, изложенными в ОФС.1.5.1.0001.15 «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения». В проекте ОФС «Лекарственное растительное сырье для гомеопатических лекарственных препаратов» изложены требования, предъявляемые к свежему ЛРС.

Сырье животного происхождения, используемое в гомеопатической практике, может быть представлено целыми животными (чаще всего насекомыми), отдельными их частями, включая железы и выделения из них, а также биологическими жидкостями и выделениями.

Сырье минерального и химического происхождения для ГомЛП, как правило, представлено природными минералами, металлами и их солями, неметаллами и их соединениями, горными породами, ископаемым топливом (нефть, бурый и каменный уголь и др.), золой растений или животных и/или их частей, в том числе продуктами их совместного обжига (прокаливания) с другими неорганическими соединениями, а также продуктами химических реакций/химического синтеза; используется для производства/изготовления ГомЛС.

Анализ данных литературы, в том числе фармакопейных стандартов на гомеопатические фармацевтические субстанции, а также нормативной документации производителей ЛП, присутствующих на

Таблица 1. Требования к качеству настойки гомеопатической матричной *Calendula officinalis* согласно монографиям зарубежных фармакопей и проектам ФС для Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ XIV)

Table 1. Requirements for the quality of *Calendula officinalis* homeopathic mother tincture laid out in foreign pharmacopoeias and in draft monographs to be included into the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed.

Фармакопея / нормативная документация	Лекарственное растительное сырье	Концентрация спирта / соотношение сырье — экстрагент	Показатели качества
Гомеопатическая фармакопея Германии [2]	Вся свежая цветущая надземная часть растения	86 % (по массе) / (1:1,2), условно считая потерю в массе при высушивании сырья 60 %	Плотность: 0,895–0,915. Сухой остаток: не менее 1,0 %
Фармакопея Франции [8]	Свежие листья	1:10, считая на сухое сырье (или 1:4 — на свежее)	Содержание спирта 50–60 % (по объему). Сухой остаток: не менее 1,00 %. Количественное определение: суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид не менее 0,01 %
Гомеопатическая фармакопея Бразилии [5]	Цветущие верхушки (свежие или высушенные)	65 % (по объему) / 1:10 (считая на сухое сырье)	Содержание спирта 50–60 % (по объему). Сухой остаток: не менее 0,75 %
Проект ФС для ГФ XIV	Цветки высушенные	62 % (по массе) / 1:10 (по способу 4 ОФС «Настойки гомеопатические матричные»)	Плотность: 0,895–0,915. Сухой остаток: не менее 2,0 %. Количественное определение: суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 0,05 %
Проект ФС для ГФ XIV	Трава цветущая свежая	86 % (по массе) / по способу 3 ОФС «Настойки гомеопатические матричные»	Плотность: 0,895–0,916. Сухой остаток: не менее 1,0 %. Количественное определение: суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 0,015 %

фармацевтическом рынке, позволил выявить номенклатуру сырья и гомеопатических фармацевтических субстанций, наиболее часто используемых для производства гомеопатических препаратов [12, 13].

Для гомеопатических фармацевтических субстанций из ЛРС в монографиях фармакопей указывается используемая часть растения (корни, цветки, плоды, листья и т.д. или растение целиком), время заготовки, метод получения настойки гомеопатической матричной (НГМ). Примером могут служить монографии на *Calendula officinalis* НГМ (табл. 1).

В ряде случаев в монографиях различных фармакопей описаны гомеопатические средства, полученные разными методами, для оценки качества которых могут быть использованы идентичные методы, а допустимые нормы содержания могут различаться. В случае, когда НГМ получают из растительного сырья различными способами, в названии НГМ дополнительно должна быть указана цифра или цифра в сочетании с буквой, обозначающие способ получения согласно ОФС «Настойки гомеопатические матричные».

Различие в состоянии исходного ЛРС и технологии получения обуславливает возможные отличия количественного состава биологически активных веществ НГМ. В качестве примера в таблице 2 приведены допустимые нормы содержания суммы алкалоидов в ряде НГМ, регламентируемые монографиями зарубежных фармакопей.

При использовании субстанций химического происхождения возможно включение в монографию химических соединений, несколько отличающихся по своему составу, например:

1) для солей это использование соединений металлов, имеющих различную валентность, например *Ferrum phosphoricum* — это в одном случае железа (III) фосфат [2], в другом как железа (II), так и железа (III) фосфат [4];

2) содержание различного количества кристаллизационной воды (что отражается на содержании активного компонента при приготовлении гомеопатических разведений). Например, в Гомеопатической фармакопее США используется эскулин безводный ($C_{15}H_{16}O_9$), а в Гомеопатической фармакопее Германии — с содержанием кристаллизационной воды ($C_{15}H_{16}O_9 \times 1,5 H_2O$) [2, 4];

3) субстанции с разным содержанием активного компонента, например для *Acidum hydrochloricum* в качестве активной субстанции используется в одном случае кислота 9,5–10,5 %, в другом — 36,5–38,0 % [2, 4];

4) соли кислые или основные (названию *Calcium phosphoricum* отвечает как кальция фосфат, так и кальция гидрофосфат);

5) смеси веществ разного состава, например, *Chininum arsenicosum* соответствуют или смеси хинина и мышьяка (III) оксида, или хинина и мышьяковистой кислоты [12].

Однако правомочность их использования для лечения заболеваний по одним и тем же показаниям должна быть подтверждена клиническими исследованиями.

Настойки гомеопатические матричные из сырья растительного и животного происхождения наиболее часто используются для производства/изготовления ГомЛП. Методы получения и оценки качества указанной категории гомеопатических фармацевтических субстанций приведены в соответствующей ОФС. Метод приготовления настоек зависит от физического состояния сырья (свежее или высушенное), содержания тех или иных основных групп биологически активных веществ, влажности. При этом наряду с основными методами технологии (мацерацией и перколяцией) используется также «соковая» технология, основанная на получении сока и смешивании его со спиртом этиловым.

Таблица 2. Нормируемое содержание алкалоидов в настойках гомеопатических матричных (НГМ)

Table 2. Requirements for alkaloid content in homeopathic mother tinctures (HMT)

Наименование НГМ	Гомеопатическая фармакопея Германии [2]	Фармакопея Франции [8]
<i>Atropa belladonna</i>	ЛРС: целое свежее растение, собранное в конце цветения. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин должно быть 0,055–0,100 %	ЛРС: целое свежее цветущее растение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на гиосциамин должно быть 0,015–0,025 %
<i>Aconitum napellus</i>	ЛРС: целое свежее растение, собранное в начале цветения. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на аконитин должно быть 0,09–0,18 %	ЛРС: целое свежее цветущее растение. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на аконитин должно быть 0,02–0,05 %
<i>Datura stramonium</i> (<i>Stramonium</i>)	ЛРС: свежая надземная часть растения. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на атропин должно быть 0,008–0,040 %	ЛРС: свежая надземная часть растения, заготовленного во время цветения. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на аконитин должно быть 0,01–0,03 %
<i>Schoenocaulon officinale</i> (<i>Sabadilla</i>)	ЛРС: высушенные спелые семена. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на цевадин должно быть не менее 0,32 % и не более 0,60 %	ЛРС: высушенные семена. Содержание суммы алкалоидов в пересчете на цевадин должно быть не менее 0,20 % и не более 0,40 %
<i>Strychnos nux-vomica</i> (<i>Nux vomica</i>)	ЛРС: высушенные спелые семена. Содержание суммы стрихнина и бруцина от 0,18 до 0,27 %, из которых стрихнина не менее 43 % и не более 55 %	ЛРС: высушенные семена. Стрихнина 0,12–0,17 %

Методы получения гомеопатических разведений непосредственно связаны с методами получения настоек гомеопатических матричных. В связи с этим после изложения основного метода получения настоек в проекте ОФС приведено также краткое описание способов получения разведений десятичной и сотенной шкал. Методы оценки качества настоек гомеопатических матричных включают: определение подлинности качественными реакциями и методом ТСХ, количественное определение с использованием методов УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ и др.

В гомеопатической практике используются также настойки гомеопатические ферментированные, которые представляют собой водные извлечения из свежего или высушенного ЛРС, получаемые путем ферментации при заданных параметрах. Эти настойки также используются в качестве фармацевтических субстанций для получения ГомЛП в различных ЛФ. При производстве/изготовлении настоек гомеопатических ферментированных необходимо строго соблюдать такие условия, как температурный режим, значение pH среды, продолжительность настаивания и режим перемешивания. При производстве/изготовлении таких настоек используются натуральный мед, лактоза, молочная сыворотка. Особенность приготовления данных настоек заключается также в том, что в ряде способов получения используется зола, получаемая из растительного сырья после его мацерации. Время изготовления таких настоек составляет не менее шести месяцев. При изготовлении настоек с использованием спирта происходит коагуляция коллоидных веществ, некоторые вещества консервируются, а вещества сложного строения распадаются на более простые. В спиртовые настойки переходит больше эфирных масел, сапонинов, при этом уменьшается суммарное содержание сухого остатка. Аминокислоты полностью экстрагируются водой, нежели спиртом.

В гомеопатии находят применение такие жидкие ЛФ, как настои и отвары, которые существенно отличаются по технологии получения этих ЛФ, применяемых аллопатической медициной. Настои и отвары гомеопатические и полученные из них разведения используют свежеприготовленными для производства/изготовления растворов для инъекций, глазных капель, гранул, суппозиторий и др.

Основными факторами, определяющими качество получаемого ГомЛП, являются использование стандартизованных гомеопатических фармацевтических субстанций и стандартных методов получения, то есть технологии. Для многокомпонентных препаратов необходимо учитывать не только химическое и фармакологическое взаимодействие компонентов, но и технологические приемы, позволяющие вводить в состав препарата компоненты в определенных разведениях [14, 15].

Наряду с исследованием биологического действия отдельных гомеопатических разведений большое внимание уделяется проблеме определения подлинности ГомЛП в высоких разведениях, которые не могут быть проанализированы традиционными методами. Исследования последних лет

направлены на решение проблемы определения подлинности таких препаратов. Рядом исследований показано, что использование таких методов, как вибрационная и рамановская спектроскопия, позволяет выявлять отличительные особенности препаратов при сверхвысоком разведении [16–18].

Современная гомеопатия предлагает пациентам и врачам широкий спектр лекарственных препаратов в различных ЛФ [19]. В настоящее время многие ГомЛП выпускаются в условиях фармацевтического производства, что обеспечивает не только их качество, но и безопасность. Это достигается соответствием качества гомеопатических субстанций и вспомогательных веществ требованиям фармакопейных стандартов и/или нормативной документации, а все этапы производства приводятся в технологических регламентах и документируются. Каждая партия препаратов проходит проверку на микробиологическую чистоту и другие показатели, определенные в ОФС на соответствующие ЛФ.

Создание общих фармакопейных и фармакопейных статей, предназначенных для последующего включения их в Государственную фармакопею Российской Федерации, позволит обеспечить нормативную базу для осуществления стандартизации и последующей оценки качества гомеопатических лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработаны современные требования к стандартизации гомеопатических лекарственных препаратов, сформулирована методология построения фармакопейных стандартов на сырье растительного, минерального и животного происхождения, используемого для производства фармацевтических субстанций, а также фармацевтические субстанции для гомеопатических лекарственных препаратов и лекарственные формы, включающие особенности технологии и стандартизации гомеопатических лекарственных средств.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИП AAAA-A18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was supported by the FSBI “SCEEMP” of the Ministry of Health of Russia and was carried out as part of a publicly funded research project (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гомеопатия в странах мира. Available from: <http://www.medkarta.ru/articles/260-gomeopatija-v-stranah-mira.html>. [Homeopathy in the world. Available from: <http://www.medkarta.ru/articles/260-gomeopatija-v-stranah-mira.html> (In Russ.)]
2. Homöopathisches Arzneibuch. Frankfurt: Deutscher Apotheker Verlag; 2014.
3. British Homeopathic Pharmacopoeia; 1993.

4. The Homeopathic Pharmacopoeia of the United States. Revision Service. Vol. 1. 1988–1990. Vol. 2. 1989–1990.
5. Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia. 3rd ed. 2011. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259147/Farmacopeia+HOMEOPATICA+3a+EDICAO+INGLES+com+alerta.pdf/49a48a50-0d3e-4ab9-bc41-eb361c8afbb1>
6. Homeopathic Pharmacopoeia of India. New Delhi: Government of India Ministry of Health and Family Welfare. Vol. 1, 1971; Vol. 2, 1974; Vol. 3, 1978; Vol. 4, 1984; Vol. 5, 1987; Vol. 6, 1990.
7. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
8. Pharmacopée Française. 11ème ed. 2012. Available from: <http://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise-Preparations-homeopathiques-Francais>
9. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». [Federal Law of the Russian Federation, April 12, 2010, No. 61-FZ «On circulation of medicines» (In Russ.)]
10. Хабриев РУ, ред. *Сборник фармакопейных статей по гомеопатии*. М.; 2005. [Khabriev RU, ed. *Collection of monographs on homeopathy*. Moscow; 2005 (In Russ.)]
11. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 27 июля 2016 г. № 538н «Об утверждении перечня наименований лекарственных форм лекарственных препаратов для медицинского применения». [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation, July 27, 2016, No. 538n «On the approval of the list of names of medicinal forms of medicinal products for medical use» (In Russ.)]
12. Патудин АВ, Мищенко ВС, Ильенко ЛИ, Космодемьянский ЛВ. *Гомеопатические лекарственные средства, разрешенные в Российской Федерации для применения в здравоохранении и ветеринарии*. М.: Знак; 2011. [Patudin AV, Mishchenko VS, Ilyenko LI, Kosmodemyansky LV. *Homeopathic medicines authorized in the Russian Federation for use in public health and veterinary medicine*. Moscow: Znak; 2011 (In Russ.)]
13. Патудин АВ, Терешина НС, Мищенко ВС, Губанов ИА. *Мировые ресурсы гомеопатического лекарственного сырья*. Киров: Дом печати — Вятка; 2006. [Patudin AV, Tereshina NS, Mishchenko VS, Gubanov IA. *World resources of homeopathic medicinal raw materials*. Kirov: Dom pechati — Vyatka; 2006 (In Russ.)]
14. Терешина НС. Принципы создания многокомпонентных гомеопатических препаратов. *Фармация*. 2005;(5):38–9. [Tereshina NS. Principles of creating multicomponent homeopathic preparations. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2005;(5):38–9 (In Russ.)]
15. Терешина НС, Костенникова ЗП, Самылина ИА. *Технология и контроль качества гомеопатических лекарственных препаратов*. М.: Первый МГМУ им. И.М. Сеченова; 2014. [Tereshina NS, Kostennikova ZP, Samylina IA. *Technology and quality control of homeopathic medicines*. Moscow: I. M. Sechenov First MSU; 2014 (In Russ.)]
16. Sukul NC, Sarkar T, Konar A, Chakraborty I, Singha A, Majumdar D, Sukul A. Raman spectroscopy reveals distinctive features of drugs at ultra high dilution. *Int J High Dilution Res*. 2016;15(4):39–40.
17. Mahata CR. Quantum electro-dynamics helps homeopathy achieve its scientific basis (paving the way for a generalized concept of medicine). *Int J High Dilution Res*. 2017;16(2):5–10.
18. Sarkar T, Konar A, Sukul NC, Singha A, Sukul A. Vibrational and Raman spectroscopy provide further evidence in support of free OH groups and hydrogen bond strength underlying difference in two more drugs at ultra high dilutions. *Int J High Dilution Res*. 2016;15(3):2–10.
19. Государственный реестр лекарственных средств. Available from: <http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>. [State register of medicines. Available from: <http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx> (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук, проф., директор Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8536-4804>

Терешина Наталья Сергеевна, д-р фарм. наук, главный аналитик отдела государственной фармакопей и фармакопейного анализа Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8421-197X>

Лякина Марина Николаевна, д-р фарм. наук, заместитель директора Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8220-1054>

Статья поступила 17.04.2018
Принята к печати 22.08.2018

AUTHORS

Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.), Professor, Director of the Centre of Pharmacopoeia and International Collaboration of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8536-4804>

Natalia S. Tereshina, Dr. Sci. (Pharm.), Chief Analyst of the Department of State Pharmacopoeia and Pharmacopoeial Analysis of the Centre of Pharmacopoeia and International Collaboration of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8421-197X>

Marina N. Lyakina, Dr. Sci. (Pharm.), Deputy Director of the Centre of Pharmacopoeia and International Collaboration of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8220-1054>

Article was received 17 April 2018
Accepted for publication 22 August 2018

Планирование и оценка исследований биоэквивалентности препаратов атазанавира

Н. Е. Уварова^{1,*}, Н. Н. Еременко¹, Г. В. Раменская^{1,2}, Д. В. Горячев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

Резюме. С целью предупреждения развития эпидемии, связанной с распространением ВИЧ-инфекции, Правительством Российской Федерации была утверждена Государственная стратегия противодействия распространению ВИЧ. Одной из задач стратегии является увеличение охвата антиретровирусной терапией зараженных ВИЧ-инфекцией, в том числе за счет широкого применения воспроизведенных лекарственных препаратов. Для регистрации воспроизведенного препарата необходимо представление отчета о результатах исследования его биоэквивалентности в сравнении с референтным препаратом. Атазанавир, используемый в антиретровирусной терапии, является приоритетным препаратом при лечении и профилактике вертикальной передачи ВИЧ у беременных. Был проведен анализ протоколов и отчетов исследований биоэквивалентности препаратов атазанавира, поступивших на экспертизу в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, с целью подготовки рекомендаций по планированию исследований их биоэквивалентности. В результате проведенного анализа ряда исследований выявлены существенные отличия в дизайне исследований и количестве добровольцев. Основной причиной указанных отличий являются противоречивые данные о коэффициенте внутрииндивидуальной вариабельности атазанавира, указывающие на возможное отнесение атазанавира к высоковариабельным препаратам. На основании анализа сформулированы рекомендации по планированию исследований биоэквивалентности препаратов атазанавира, включающие в себя проведение исследования на максимальной дозировке препарата, проведение исследования после еды и учет данных по вариабельности атазанавира при выборе дизайна исследования.

Ключевые слова: биоэквивалентность; исследования биоэквивалентности; атазанавир; воспроизведенные препараты; высоковариабельные препараты; фармакокинетика; дизайн исследований

Для цитирования: Уварова НЕ, Еременко НН, Раменская ГВ, Горячев ДВ. Планирование и оценка исследований биоэквивалентности препаратов атазанавира. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):151–157. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-151-157>

***Контактное лицо:** Уварова Наталия Евгеньевна; uvarova@expmed.ru

Planning and Evaluation of Bioequivalence Studies of Atazanavir Products

N. E. Uvarova^{1,*}, N. N. Eremenko¹, G. V. Ramenskaya^{1,2}, D. V. Goryachev¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation
² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

Abstract. The Government of the Russian Federation approved the State strategy of combating the spread of HIV aimed at prevention of HIV epidemic. One of the goals of the Strategy is to increase the coverage of antiretroviral therapy for people infected with HIV, which includes extensive use of generic drugs. In order for a generic drug to be authorised, the applicant has to submit a report on the results of the bioequivalence studies in which the generic product was compared to the reference product. Atazanavir is an antiretroviral drug, which is also the drug of choice for the treatment and prevention of mother-to-child transmission of HIV. The aim of this study was to analyze the protocols and reports of atazanavir products bioequivalence studies, which were submitted for expert examination to the FSBI “SCEEMP” of the Ministry of Health of the Russian Federation, and to prepare recommendations for planning of bioequivalence studies of atazanavir products. The analysis of a number of studies revealed significant differences in the study design and number of subjects. The main reason for these differences is the conflicting data on the intra-subject coefficient of variation of atazanavir, which means that atazanavir may be considered a highly variable drug. The analysis helped to formulate recommendations for the design of bioequivalence studies of atazanavir products, including studies of the maximum dose, studies under fed conditions, and consideration of atazanavir variation when planning the study design.

Key words: bioequivalence; bioequivalence study; atazanavir; generic drugs; highly variable drugs; pharmacokinetics; study design

For citation: Uvarova NE, Eremenko NN, Ramenskaya GV, Goryachev DV. Planning and evaluation of bioequivalence studies of atazanavir products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(3):151–157. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-151-157>

***Corresponding author:** Natalia E. Uvarova; uvarova@expmed.ru

С 2006 года в Российской Федерации отмечается ежегодный рост числа новых случаев ВИЧ-инфекции в среднем на 10 % в год [1]. С целью предупреждения развития эпидемии, связанной с распространением ВИЧ-инфекции, Правительством Российской Федерации была утверждена Государственная стратегия противодействия распространению ВИЧ-инфекции на период до 2020 года и дальнейшую перспективу. Одной из задач стратегии является увеличение охвата антиретровирусной терапией лиц, зараженных вирусом иммунодефицита человека, в том числе за счет широкого применения воспроизведенных лекарственных препаратов (ЛП) с целью снижения затрат на антиретровирусные препараты [1].

В соответствии с Федеральным законом от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (№ 61-ФЗ) для регистрации воспроизведенного препарата необходимо представление отчета о результатах исследования биоэквивалентности воспроизведенного препарата в сравнении с референтным препаратом [2]. В исследованиях биоэквивалентности с однократным приемом ЛП к исследуемым фармакокинетическим параметрам относятся: площадь под кривой «плазменная концентрация — время» с момента приема ЛП до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), площадь под кривой «плазменная концентрация — время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) и максимальная плазменная концентрация (C_{max}) [3–5]. В качестве основного критерия биоэквивалентности используют 90 % доверительные интервалы для отношения средних геометрических указанных параметров исследуемого и референтного ЛП. Такой подход равносителен двум односторонним проверкам нулевой гипотезы об отсутствии биоэквивалентности (о био-неэквивалентности) при 5 % уровне значимости для каждого теста. 90 % доверительные интервалы отношения оцениваемых фармакокинетических параметров исследуемого ЛП к референтному ЛП должны лежать в интервале 80,00–125,00 % [3–5].

Одним из препаратов, используемых в антиретровирусной терапии, является атазанавир. Атазанавир относится к классу ингибиторов протеазы ВИЧ, его механизм действия основан на ингибировании процессинга вирусных протеинов в ВИЧ-инфицированных клетках и предотвращении тем самым образования зрелых вирионов и заражения других клеток [6]. Атазанавир является приоритетным препаратом при проведении антиретровирусной терапии и профилактике вертикальной передачи ВИЧ у беременных. В схемах первого ряда он рекомендуется пациентам с повышенным уровнем холестерина, триглицеридов, глюкозы, в возрасте старше 50 лет или с нарушением углеводного или липидного обмена, а также преимущественно в бустированном (фармакокинетически усиленном) виде пациентам с непереносимостью эфавиренза и невирапина [7]. Впервые зарегистрированный на мировом рынке по результатам собственных исследований препарат атазанавира Реатаз® (регистра-

ция в США — 2003 г., в России — 2005 г.) является первым ингибитором протеазы, разрешенным для приема один раз в день [8]. Также атазанавир существенно реже вызывает такие побочные реакции, как липодистрофия и повышение уровня холестерина, по сравнению с другими ингибиторами протеазы [9].

Цель работы — подготовка рекомендаций по планированию исследований биоэквивалентности препаратов атазанавира.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен анализ протоколов и отчетов исследований биоэквивалентности, поступивших в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России за период с 2012 по 2017 г. для получения разрешения на проведение клинических исследований или с целью регистрации на основании результатов исследования биоэквивалентности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа представлены в таблицах 1 и 2. Во всех исследованиях референтным препаратом был препарат Реатаз®, капсулы, Бристол-Майерс Сквипб Компани, США. В исследованиях биоэквивалентности изучались дозы атазанавира 400 мг (2 капсулы по 200 мг) и 300 мг. Выбор доз связан с утвержденным режимом дозирования референтного препарата [6] и дозами, которые были использованы при исследованиях его фармакокинетики: 400 мг (2 капсулы по 200 мг) атазанавира и 300 мг атазанавира в комбинации со 100 мг ритонавира [6, 10, 11]. Также исследуемая доза зависит от линейности фармакокинетики препарата. В зарубежных инструкциях указано, что фармакокинетика атазанавира не линейна, и в диапазоне доз от 200 до 800 мг степень увеличения AUC и C_{max} больше, чем степень увеличения дозы [10, 11]. Это указывает на необходимость проведения исследования биоэквивалентности для наибольшей дозировки, что согласуется с подходами к исследованию биоэквивалентности ЛП с нелинейной фармакокинетикой Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА) [5], Евразийского экономического союза (ЕАЭС) [4] и Руководства по экспертизе лекарственных средств [3].

Согласно подходу Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (FDA) для препаратов атазанавира рекомендуется проведение двух исследований биоэквивалентности: натощак и после приема пищи [12]. При этом изучаемой является дозировка 300 мг и используется простой перекрестный дизайн, измеряется концентрация атазанавира в плазме крови. В инструкции по применению препарата Реатаз® [6] указано, что применение препарата с пищей улучшает биодоступность атазанавира и уменьшает его фармакокинетическую вариабельность. Таким образом, можно сделать вывод, что рекомендуется проведение исследования биоэквивалентности после приема пищи, что и наблюдается в большинстве изученных исследований. Рекомендации проведения исследований биоэквивалентности максималь-

Таблица 1. Данные проанализированных исследований биоэквивалентности препаратов атазанавира в лекарственной форме капсулы

Table 1. Data on the analysed bioequivalence studies of atazanavir products in the form of capsules

Дозировка в ЛП, мг	Дизайн	Схема приема препаратов	Доза в КИ, мг	Прием	Количество добровольцев (пол)	Длитель- ность отбора проб, ч	CV_{intra}
300	Простое перекрестное	TR RT	300	Натощак	72 (МЖ)	48	Нет данных
300	Простое перекрестное	TR RT	300	Натощак	48 (МЖ)	36	C_{max} — 49,21 % AUC_{0-1} — 46,62 % $AUC_{0-\infty}$ — 46,29 %
300	Перекрестное четырёхпери- одное	TTRR RRTT TRRT RTTR	300	После еды	112 (МЖ)	36	C_{max} — 32,71 % AUC_{0-1} — 26,94 % $AUC_{0-\infty}$ — 31,02 %
300	Простое перекрестное	TR RT	300	После еды	34 (М)	36	Нет данных
300	Перекрестное четырёхпери- одное	TRTR RTRT	300	После еды	48 (МЖ)	36	Нет данных
300	Простое перекрестное	TR RT	300	После еды	60 (МЖ)	30	Нет данных
300	Простое перекрестное	TR RT	300	После еды	38 (М)	48	Нет данных
200	Простое перекрестное	TR RT	400	Натощак	36 (М)	72	Нет данных
200	Простое перекрестное	TR RT	400	После еды	28 (М)	48	Нет данных
200	Простое перекрестное	TR RT	400	После еды	70 (М)	48	Нет данных
200	Перекрестное трехпериодное	TRT RTR	400	После еды	34 (МЖ)	36	Нет данных

Примечание. ЛП — лекарственный препарат, КИ — клиническое исследование, Т — исследуемый препарат, R — референтный пре-
парат, М — мужчины, Ж — женщины, CV_{intra} — коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности.

Таблица 2. Сведения об аналитическом методе, использованном в исследованиях биоэквивалентности препаратов атазанавира в лекарственной форме капсулы

Table 2. Information on the analytical method used in the bioequivalence studies of atazanavir products in the form of capsules

Дозировка в ЛП, мг	Страна происхождения	Метод	Пробоподготовка	НПКО, нг/мл
300	Зарубежный (Хорватия)	ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ / осаждение белков / ТФЭ	≤10
300	Отечественный	ВЭЖХ-МС/МС	Осаждение белков	5
300	Отечественный	ВЭЖХ-МС/МС	Осаждение белков	5
300	Отечественный	ВЭЖХ-МС/МС	Нет данных	50
300	Отечественный	ВЭЖХ-МС/МС	Осаждение белков / ТФЭ	4–5
300	Зарубежный (Индия)	ВЭЖХ-МС/МС	Нет данных	≤500
300	Отечественный	ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	≈50
200	Отечественный	ОФ-ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ / осаждение белков	≈100
200	Зарубежный (Индия)	ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	0,01
200	Зарубежный (Индия)	ВЭЖХ-МС/МС	Нет данных	50
200	Отечественный	ВЭЖХ-МС/МС	Нет данных	50

Примечание. ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией, ОФ-ВЭЖХ-УФ —
обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием, ЖЖЭ — жидкость-жид-
костная экстракция, ТФЭ — твердофазная экстракция, НПКО — нижний предел количественного определения.

ной дозировки атазанавира после приема пищи согласуются с данными литературы [13].

В соответствии с Методическими указаниями «Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств» [14] схема отбора проб определяется формой кривой «концентрация действующего вещества — время» (фармакокинетическая кривая), а выбор моментов времени отбора проб должен обеспечивать получение нескольких точек для каждого фрагмента фармакокинетической кривой — не менее 2 для фазы первоначального возрастания концентрации и не менее 5 для фазы ее снижения. При этом общая продолжительность наблюдения за концентрацией действующего вещества при однократном приеме лекарственного средства должна быть не менее чем в 4 раза больше периода полувыведения [14]; длительность наблюдения считается удовлетворительной, если AUC_{0-t} перекрывает не менее 80 % от $AUC_{0-\infty}$ [3–5]. С учетом периода полувыведения ($t_{1/2}$) атазанавира, равного 7 ч (средний $t_{1/2}$ у здоровых добровольцев и ВИЧ-инфицированных пациентов [6, 10]), длительность отбора проб должна быть более 28 ч. Все рассмотренные исследования соответствуют данным требованиям: длительность отбора проб крови в большинстве случаев составляла 36 ч и более, что согласуется с фармакокинетикой атазанавира.

Длительность «периода отмывки» в большинстве исследований составляла 7 сут и только в одном — 5 сут. Данный параметр обусловлен величиной $t_{1/2}$ атазанавира. Согласно отечественным Методическим указаниям по проведению исследований биоэквивалентности [14] длительность периода между приемами препаратов («периода отмыв-

ки») должна составлять не менее $6t_{1/2}$. Руководство по проведению исследований биоэквивалентности ЕМА [5] и Правила проведения исследований биоэквивалентности ЛП в рамках ЕАЭС [4] определяют достаточный период отмывки, равный $5t_{1/2}$. Для атазанавира $t_{1/2}$ равен 7 ч, рассчитанная длительность периода отмывки составляет 1,46–1,75 сут. В проанализированных исследованиях периоды отмывки 5 и более сут соответствуют требованиям нормативных документов. В подавляющем большинстве исследований выбран период отмывки в 7 сут, что обеспечивает удобство работы клинических центров.

Количество добровольцев варьировало от 28 до 112 человек и в среднем составляло 53 человека. Выбор количества добровольцев основывался на коэффициенте внутрииндивидуальной вариабельности (CV_{intra}) атазанавира по данным литературы. Данные о CV_{intra} также влияли на выбор дизайна исследований: для большинства исследований был выбран простой перекрестный дизайн, однако три исследования предусматривали репликативные дизайны (с двумя последовательностями и тремя периодами; с двумя последовательностями и четырьмя периодами; с четырьмя последовательностями и четырьмя периодами).

В таблице 3 представлены результаты проведенного анализа коэффициента вариабельности атазанавира по данным сети Интернет [15–18]. В открытом доступе недостаточно источников, содержащих информацию о коэффициенте вариабельности атазанавира, полученном из исследований, в которых атазанавир принимался вне комбинации с другими препаратами. Нами было найдено только одно подобное исследование, в котором коэффициенты ва-

Таблица 3. Анализ данных литературы исследований биоэквивалентности атазанавира [15–18]

Table 3. Analysis of literature data on atazanavir bioequivalence studies [15–18]

Источник	CV_{intra}	Дизайн	Схема приема препаратов	Доза в КИ, мг	Прием	Количество добровольцев	Длительность отбора проб, ч
Mylan Laboratories Ltd. EPAR [15]	C_{max} — 41,73 % AUC_{0-t} — 35,83 % $AUC_{0-\infty}$ — 34,4 %	Простое перекрестное	TR RT	ATV 300	После еды	70	24
Комбинированные препараты							
(Mylan Laboratories Ltd), HA507 WHOPAR [16]	C_{max} — 22 % AUC_{0-t} — 21,3 % $AUC_{0-\infty}$ — 21,43 %	Простое перекрестное	TR RT	ATV 300 + RTV 100	После еды	55	48
I. Bhushan et al. [17]	C_{max} — 24,43 % AUC_{0-t} — 22,51 % $AUC_{0-\infty}$ — 21,63 %	Простое перекрестное	TR RT	ATV 300 + RTV 100	После еды	55	48
I. Bhushan et al. [17]	C_{max} — 48,46 % AUC_{0-t} — 42,71 % $AUC_{0-\infty}$ — 40,29 %	Простое перекрестное	TR RT	ATV 300 + RTV 100	Натощак	56	48
H. Sevinsky et al. [18]	C_{max} — 19,75 % AUC_{0-t} — 17,5 % $AUC_{0-\infty}$ — 17,5 %	Простое перекрестное	TR RT	ATV 300 + COBI 150	После еды	62	48
H. Sevinsky et al. [18]	C_{max} — 45,11 % AUC_{0-t} — 39,86 % $AUC_{0-\infty}$ — 39,63 %	Простое перекрестное	TR RT	ATV 300 + COBI 150	Натощак	63	48

Примечание. ATV — атазанавир, RTV — ритонавир, COBI — кобицистат.

риабельности составляли 41,73 % для $C_{\max}$, 83 % для AUC_{0-t} и 34,4 % для $AUC_{0-\infty}$ [15].

В отсутствие данных о CV_{intra} атазанавира некоторые заявители при расчете необходимого количества добровольцев использовали значения коэффициентов вариации по данным фармакокинетических исследований референтного препарата Реатаз®, представленным в таблице 4 [10]. При этом указывалось, что коэффициент вариации больше CV_{intra} .

В большинстве доступных источников описаны исследования, где применялись комбинации атазанавира с другими антиретровирусными препаратами: ритонавиром (в дозе 100 мг) и кобицистатом (в дозе 150 мг). Ритонавир используется в качестве компонента, увеличивающего экспозицию атазанавира, его действие основано на способности ингибировать метаболизм, опосредованный изоферментом цитохрома CYP3A4 [19]. Кобицистат имеет сходный с ритонавиром механизм действия, но на сегодняшний день не зарегистрирован в Российской Федерации.

Как следует из данных, представленных в таблице 3, вариабельность атазанавира в указанных исследованиях сильно отличается, однако можно выявить некоторые закономерности. Наиболее вариабельным параметром является $C_{\max}$, разброс значений CV_{intra} которого колеблется от 20 до 49 %. Вариабельность атазанавира значительно ниже при приеме после еды по сравнению с приемом натощак: например, в исследовании I. Bhushan и др. [17] CV_{intra} по $C_{\max}$ составляла 24,43 % после еды и 48,46 % натощак. Аналогичное снижение CV_{intra} при приеме после еды наблюдается и в других исследованиях и для других показателей фармакокинетики [17, 18].

Данные о том, что CV_{intra} атазанавира превышает 30 %, указывают на возможность отнесения атазанавира к высоковариабельным препаратам. У высоковариабельных препаратов может наблюдаться несоответствие стандартным критериям биоэквивалентности в исследованиях с простым

перекрестным дизайном, и для подтверждения биоэквивалентности может потребоваться включение в исследование значительно большего числа добровольцев [20, 21]. Руководства по биоэквивалентности EMA [5], FDA [22] и ЕАЭС [4] и Руководство по экспертизе лекарственных средств [3] рекомендуют для высоковариабельных препаратов проведение исследований с репликативным (повторным) дизайном. В этом случае при подтверждении того, что вариабельность $C_{\max}$ референтного ЛП в исследовании действительно превышает 30 %, критерий приемлемости для $C_{\max}$ может быть расширен в зависимости от значения CV_{intra} , максимально до 69,84–143,19 % (метод масштабирования SABE, scaled average bioequivalence [23]). Расширение приемлемых границ биодоступности на основании внутрииндивидуальной вариабельности не распространяется на AUC , границы которой вне зависимости от вариабельности должны быть ограничены интервалом 80,00–125,00 % [3, 4, 22].

На основании данных, представленных в таблице 2, можно заключить, что в большинстве исследований в качестве биоаналитического метода была выбрана высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Это объясняется преимуществами указанного метода, основными из которых являются быстрота анализа, высокая селективность и низкий предел обнаружения. Одним из важных параметров биоаналитической методики является нижний предел количественного определения (НПКО) — наименьшая концентрация анализируемого вещества в образце, которая поддается надежному количественному определению с приемлемой правильностью и прецизионностью [5]. Согласно международным требованиям [3–5] НПКО должен соответствовать ожидаемым концентрациям и целям исследования: так, в исследовании биоэквивалентности НПКО не должен превышать 5 % от $C_{\max}$.

Таблица 4. Равновесная фармакокинетика атазанавира у здоровых добровольцев [10]

Table 4. Steady-state pharmacokinetics of atazanavir in healthy volunteers [10]

Параметр исследования	Доза препарата, мг	
	400 один раз в день	300 с ритонавиром 100 один раз в день
$C_{\max}$ (нг/мл)		
Среднее геометрическое (CV, %)	5199 (26)	6129 (31)
Среднее (SD)	5358 (1371)	6450 (2031)
$T_{\max}$		
Медиана	2,5	2,7
AUC (нг×ч/мл)		
Среднее геометрическое (CV, %)	28132 (28)	57039 (37)
Среднее (SD)	29303 (8263)	61435 (22911)
$t_{1/2}$ (ч)		
Среднее (SD)	7,9 (2,9)	18,1 (6,2)

Примечание. CV — коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение), SD — стандартное отклонение.

Представленные в таблице 2 значения НПКО варьируют в диапазоне от 0,01 до 500 нг/мл. По данным литературы, минимальное среднее арифметическое $C_{\max}$ — 1479,61 нг/мл (при приеме атаканавира в дозе 300 мг) [15]. Таким образом, НПКО не должен превышать 74 нг/мл. Однако следует принимать во внимание, что, согласно требованиям ЕАЭС, НПКО рассчитывается исходя из минимальной величины $C_{\max}$ из всей выборки субъектов [4]. В проанализированных исследованиях минимальное значение $C_{\max}$ составляло 60,8 нг/мл, при этом рассчитанное значение НПКО равно 3 нг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании проведенного анализа исследований подготовлены рекомендации для планирования и проведения исследований биоэквивалентности препаратов атаканавира:

1. В качестве референтного препарата рекомендуется использовать препарат Реатаз®, капсулы, Бристол-Майерс Сквибб Компани, США.

2. Рекомендуется проведение исследования с приемом препарата после еды для уменьшения вариабельности фармакокинетических параметров и улучшения биодоступности.

3. Рекомендуется проведение исследования для максимальной дозировки (300 мг или 400 мг (2 таблетки по 200 мг)) в связи с нелинейной фармакокинетикой атаканавира и обозначенным в инструкциях по применению режимом дозирования.

4. Длительность забора образцов крови должна быть не менее 28 ч, период отмывки 7 сут.

5. При планировании дизайна исследования и расчете количества добровольцев рекомендуется учитывать всю совокупность данных о вариабельности атаканавира и его возможную высокую вариабельность.

6. В качестве аналитического метода определения атаканавира в плазме крови рекомендуется использовать метод ВЭЖХ-масс-спектрометрическим или tandemным масс-спектрометрическим детектированием. При этом значение НПКО не должно превышать 5 % от $C_{\max}$.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was supported by the FSBI "SCEEMP" of the Ministry of Health of Russia and was carried out as part of a publicly funded research project (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 20 октября 2016 г. № 2203-р «Об утверждении Государственной стратегии противодействия распространению ВИЧ-инфекции в Российской

- Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». [Directive of the Government of the Russian Federation, October 20, 2016, No. 2203-r «On approval of the State strategy to combat the spread of HIV in Russia through 2020 and beyond» (In Russ.)]
2. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». [Federal Law of the Russian Federation, April 12, 2010, No. 61-FZ «On circulation of medicines» (In Russ.)]
3. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013. [Guidance on evaluation of medicines. V. I. Moscow: Grif i K; 2013 (In Russ.)]
4. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». [Decision of the Council of the Eurasian economic commission, November 3, 2016, No. 85 «On approval of Rules of conducting bioequivalence studies of medicines within the framework of the Eurasian Economic Union» (In Russ.)]
5. Investigation of bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1). EMA. London; 2010.
6. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Реатаз®. Государственный реестр лекарственных средств. [Reyataz® prescribing information. State register of medicines (In Russ.)] Available from: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=0aba4c49-64cd-4b90-95e7-07d4f758f6d6&t=178f2068-1800-407e-85dd-c36b690e56bf
7. Покровский ВВ, Юрин ОГ, Кравченко АВ, Беляева ВВ, Ермак ТН, Канестри ВГ и др. Национальные рекомендации по диспансерному наблюдению и лечению больных ВИЧ-инфекцией (клинический протокол). *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2016;(6, Прил.). [Pokrovsky VV, Yurin OG, Kravchenko AV, Belyaeva VV, Ermak TN, Kanestri VG, et al. National recommendation on dispensary observation and treatment of person living with HIV (clinical protocol). *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktualnye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items.* 2016;(6, Suppl.) (In Russ.)]
8. Атаканавир. Вопросы из практики. М.: Фонд развития межсекторного социального партнерства; 2011. [Atazanavir. Questions of practice. Moscow: The Social Partnership Development Fund; 2011 (In Russ.)]
9. Dolin R, Masur H, Saag M, eds. *AIDS Therapy*. 3rd ed. New York: Elsevier; 2008.
10. Full prescribing information for Reyataz (Revised: September 2016). US FDA. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/021567s040,206352s005lbl.pdf
11. Reyataz. Summary of product characteristics. EMA. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000494/WC500056380.pdf
12. Guidance on Atazanavir Sulfate. US FDA. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm082565.pdf>
13. Shimpi S. Bioequivalence study recommendation for atazanavir sulfate capsules by US FDA and a contrary view. *Open Access Scientific Reports*. 2012;1(8):388. <https://doi.org/10.4172/scientificreports.388>
14. Бондарева ИБ, Герасимов ВБ, Дрожжин АП, Жердев ВП, Колыванов ГБ, Кондратенко СН и др. Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств. Методические указания Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 10.08.2004 г. *Клиническая фармакокинетика*. 2005;(1):2–14. [Bondareva IB, Gerasimov VB, Drozhzhin AP, Zherdev VP, Kolyvanov GB, Kondratenko SN, et al. Conducting qualitative studies of bioequivalence of drugs. Guidelines of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, August 10, 2004. *Klinicheskaya farmakokinetika = Clinical Pharmacokinetics*. 2005;(1):2–14 (In Russ.)]
15. Atazanavir Mylan: EPAR — Public assessment report (EMA/503216/2016, June 23, 2016). European Medicines Agency. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/004048/WC500220527.pdf
16. Atazanavir (as Sulfate)/Ritonavir 300mg/100mg Tablets (Mylan Laboratories Ltd), HA507. WHO Public assessment report, Part 6, Janu-

- ary 2013. Available from: <https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/documents/HA507Part6v1.pdf>
17. Bhushan I, Deshmukh A, Chakraborty S, Dixit A, Shetiya P, Kothawade U, et al. Open label, randomized, crossover, single-dose, bioavailability evaluation of Atazanavir/Ritonavir FDC tablets 300 mg/100 mg with that of REYATAZ 300 mg and Norvir 100 mg under fed and fasting conditions. *20th International AIDS Conference. Melbourne, Australia, July 20–25, 2014*. Melbourne; 2014. Available from: <http://pag.aids2014.org/EPosterHandler.axd?aid=1884>
18. Sevinsky H, Tao X, Wang R, Ravindran P, Sims K, Xu X, et al. A randomized trial in healthy subjects to assess the bioequivalence of an atazanavir/cobicistat fixed-dose combination tablet versus administration as separate agents. *Antivir Ther*. 2015;20(5):493–500. <https://doi.org/10.3851/IMP2913>
19. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Норвир®. Государственный реестр лекарственных средств. [Norvir® prescribing information. State register of medicines (In Russ.)] Available from: http://grls.rosminzdrav.ru/GrLs_View_v2.aspx?routingGuid=c1fc79e1-5c2b-4777-8a91-ba473474c0b2&t=221d8480-6641-495f-9a5e-800947ecf611
20. Ромодановский ДП, Драницына МА, Горячев ДВ, Ниязов РР, Гавришина ЕВ. Планирование дизайна и оценка результатов исследований биоэквивалентности высоковариабельных препаратов на примере розувастатина. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015;78(6):19–25 [Romodanovsky DP, Dranitsyna MA, Goryachev DV, Niyazov RR, Gavrishina EV. Design planning and evaluation of bioequivalence results of highly variable preparations based on rosuvastatin. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*. 2015;78(6):19–25 (In Russ.)]
21. Ромодановский ДП, Еременкова ТВ, Драницына МА, Горячев ДВ, Ниязов РР, Гавришина ЕВ, Меркулов ВА. Высоковариабельные лекарственные препараты — особенности исследования биоэквивалентности. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2015;(4):5–10. [Romodanovsky DP, Eremenkova TV, Dranitsyna MA, Goryachev DV, Niyazov RR, Gavrishina EV, Merkulov VA. Highly variable medicines — specific aspects of bioequivalence studies. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2015;(4):5–10 (in Russ.)]
22. Bioavailability and bioequivalence studies submitted in NDAs or INDs — General considerations. US FDA. 2014.
23. Haidar SH, Davit B, Chen ML, Conner D, Lee L, Li QH, et al. Bioequivalence approaches for highly variable drugs and drug products. *Pharm Res*. 2008;25(1):237–41. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9434-x>

ОБ АВТОРАХ

Уварова Наталья Евгеньевна, эксперт 2-й категории управления № 1 по эффективности и безопасности лекарственных средств Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6718-695X>

Еременко Наталья Николаевна, канд. мед. наук, главный эксперт управления № 1 по эффективности и безопасности лекарственных средств Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2385-7114>

Раменская Галина Владиславовна, д-р фарм. наук, проф., заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8779-3573>

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук, директор Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

AUTHORS

Natalia E. Uvarova, 2nd Professional Category Expert of Division No. 1 for Medicinal Products' Efficacy and Safety of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6718-695X>

Natalia N. Eremenko, Cand. Sci. (Med.), Chief Expert of Division No. 1 for Medicinal Products' Efficacy and Safety of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2385-7114>

Galina V. Ramenskaya, Dr. Sci. (Pharm.), Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of I. M. Sechenov First MSU, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8779-3573>

Dmitry V. Goryachev, Dr. Sci. (Med.), Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Статья поступила 01.02.2018
Принята к печати 22.08.2018

Article was received 1 February 2018
Accepted for publication 22 August 2018



Рентгеновская порошковая дифрактометрия: контроль качества лекарственных средств

В. С. Кузьмин^{1,*}, В. В. Чернышев², А. И. Лутцева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»,
Ленинские Горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119991, Российская Федерация

Резюме. Рентгеновская порошковая дифрактометрия является одним из методов, использующихся для обнаружения и исследования полиморфных модификаций фармацевтических субстанций. Приведено понятие полиморфизма, кратко изложен физический смысл данного явления, условия полиморфных переходов и распространенность полиморфных модификаций среди субстанций лекарственных средств. Отмечено, что полиморфизм выявлен для лекарственных веществ самых различных фармакологических групп. Полиморфные модификации одного и того же лекарственного вещества обладают различной растворимостью, температурой плавления, стойкостью к окислению и другим деструктивным процессам и, следовательно, неодинаковыми поверхностными свойствами, от которых зависит как скорость абсорбции лекарственных веществ, так и их стабильность в лекарственных формах. В связи с этим сформулирована необходимость контроля качества фармацевтических субстанций на возможность наличия полиморфных модификаций. На примере изучения дифракционными методами криомодифицированных форм различных биологически активных соединений, полученных испарением с последующим осаждением при низких температурах, установлено получение поликристаллических веществ с новыми свойствами. Приведены данные об исследованиях кристаллических модификаций феназепама в виде α - и β -полиморфов, тилорона, фабомотизола, золендроновой кислоты и дегидроэпиандростерона. Показано, что применение метода рентгенофазового анализа при изучении и контроле полиморфных модификаций лекарственных средств необходимо при оценке их качества по показателю «Подлинность».

Ключевые слова: экспертиза качества; полиморфизм; полиморфные модификации; рентгенофазовый анализ; феназепам; тилорон; фабомотизол; золендроновая кислота; дегидроэпиандростерон

Для цитирования: Кузьмин ВС, Чернышев ВВ, Лутцева АИ. Рентгеновская порошковая дифрактометрия: контроль качества лекарственных средств. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):158–161. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-158-161>

***Контактное лицо:** Кузьмин Владимир Семенович; KuzminVS@expmed.ru

X-ray Powder Diffraction in Quality Control of Medicines

V. S. Kuzmin^{1,*}, V. V. Chernyshev², A. I. Luttseva¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² M.V. Lomonosov Moscow State University,
1/3 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation

Abstract. X-ray powder diffraction is one of the methods used for detection and analysis of polymorphic forms of pharmaceutical substances. The article elucidates the concept of polymorphism, briefly explains physical characteristics of this phenomenon, conditions of polymorphic transformations and the prevalence of polymorphic forms among drug substances. It should be noted that polymorphism is observed in drug substances belonging to different pharmacologic classes. Polymorphic forms of the same drug substance have different solubility, melting point, resistance to oxidation and to other destructive processes, and, consequently, different surface properties which affect both the rate of absorption of the drug substances and their stability as components of dosage forms. This calls for the need to control the quality of drug substances for potential presence of polymorphic forms. The use of diffraction methods for examination of cryomodified forms of various biologically active compounds obtained by evaporation and subsequent precipitation at low temperatures resulted in obtaining polycrystalline substances with new properties. The article provides results of examination of crystalline modifications of phenazepam in the form of α - and β -polymorphs, tilorone, fabomotizole, zolendronic acid and dehydroepiandrosterone. It was demonstrated that the use of X-ray diffraction analysis for examination and quality control of polymorphic forms of drugs is a necessary component of identification testing.

Key words: quality control; polymorphism; polymorphic forms; X-ray diffraction analysis; phenazepam; tilorone; fabomotizole; zolendronic acid; dehydroepiandrosterone

For citation: Kuzmin VS, Chernyshev VV, Luttseva AI. X-ray powder diffraction in quality control of medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(3):158–161. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-158-161>

***Corresponding author:** Vladimir S. Kuzmin; KuzminVS@expmed.ru

Экспертиза качества лекарственных средств предусматривает их анализ по целому ряду показателей, в том числе по показателю «Подлинность». Объективная оценка подлинности фармацевтических субстанций, представляющих собой мелкокристаллический или аморфный порошок, может быть проведена с использованием метода рентгеновской порошковой дифрактометрии (метода рентгенофазового анализа, РФА).

Цель работы — обоснование необходимости использования метода РФА при контроле качества фармацевтических субстанций на примере отдельных лекарственных средств.

Основные принципы метода РФА и некоторые примеры его применения изложены в работе [1]. Помимо подтверждения кристаллической формы субстанции метод РФА позволяет не только оценивать степень ее кристалличности, но и устанавливать возможность наличия полиморфных модификаций.

В Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания (ГФ XIII) ОФС 1.1.0017.15 «Полиморфизм» приведено определение полиморфизма как «способности вещества существовать в различных кристаллических формах при одинаковом химическом составе» [2].

Физический смысл явления полиморфизма заключается в разных способах упаковки молекул в кристалле, что может быть вызвано либо различиями во взаимной ориентации молекул относительно друг друга, либо изменением конформации молекул с последующим изменением их взаимного расположения в кристалле. Это явление широко распространено среди молекулярных кристаллов, к которым относится большинство лекарственных субстанций. Полиморфные переходы могут происходить при растворении, плавлении, изменении температуры или давления, поскольку полиморфные модификации являются термодинамическими фазами, устойчивыми лишь в определенных внешних условиях. Полиморфные модификации весьма распространены среди фармацевтических субстанций.

Исследование полиморфизма биологически активных органических соединений и, прежде всего, лекарственных веществ началось в конце 30-х годов прошлого столетия. В 1937 г. был обнаружен полиморфизм сульфаниламида, в 1941 г. выделены и изучены рентгенографически его полиморфные модификации. Первый обзор о полиморфизме веществ, применяемых в фармацевтической практике, был опубликован в 1969 г.

В настоящее время полиморфизм выявлен более чем для 70 % лекарственных веществ самых различных фармакологических групп [3]. Наличие полиморфизма было отнесено к тем чрезвычайно важным факторам, которые оказывают существенное влияние на параметры биологической активности лекарственного средства и которые нельзя не учитывать в процессе изучения терапевтических свойств лекарственных форм на их основе.

Полиморфные модификации одного и того же лекарственного вещества обладают различной рас-

творимостью, температурой плавления, стойкостью к окислению и другим деструктивным процессам и, следовательно, неодинаковыми поверхностными свойствами, от которых зависит как скорость абсорбции лекарственных веществ, так и их стабильность в лекарственных формах. Поэтому «различные полиморфные модификации одной и той же фармацевтической субстанции могут оказывать разное влияние на технологию получения лекарственной формы, ее стабильность, биодоступность, фармакологическую активность и терапевтическую эффективность» [3]. Необходимо учитывать, что полиморфные изменения фармацевтических субстанций могут быть причиной быстрой инактивации препаратов, изменений физических показателей готовых лекарственных форм, химической несовместимости ингредиентов в составе одной лекарственной формы. Полиморфные модификации ряда широко применяемых лекарственных веществ различаются по химической стабильности, гигроскопичности, способности к прессованию [4].

Наличие полиморфных модификаций при контроле качества лекарственных средств оценивается методом РФА. Так, в работе И.Г. Смирновой и др. [4] рассмотрено применение РФА наряду с другими спектральными методами для контроля качества двух образцов субстанции верапамила различных производителей. Показано, что «техника X-Ray powder diffraction, инфракрасная Фурье-спектроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия, оптическая микроскопия могут с успехом применяться для контроля качества твердых кристаллических субстанций, при этом в качестве образца сравнения необходимо использовать субстанцию вещества фирмы-инноватора» [4]. В работе Е.Ю. Демченковой и др. [5] проводилось сравнение кристаллических свойств субстанций верапамила различных производителей, «показана возможность изучения качества твердых субстанций по показателям кристалличности, размера и агломерации фармацевтических субстанций».

Подробно о полиморфизме как характеристике, определяющей ключевые свойства активной фармацевтической субстанции, написано в работе Г.Н. Гильдеевой [6], которая указывает, что «наибольшую ценность с точки зрения оценки полиморфных модификаций субстанций и для контроля качества лекарственных средств представляют собой рентгеновская дифракция и термоаналитические методы — дифференциальная сканирующая калориметрия и термогравиметрия».

В качестве примеров изучения дифракционными методами полиморфных модификаций различных фармацевтических субстанций можно привести результаты исследования криомодифицированных форм биологически активных соединений (феназепам и дегидроэпиандростерона), которые подвергали испарению с последующим осаждением при низких температурах. Работы проведены группой ученых Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. При этом для феназепама было получено поликристаллическое

вещество с новыми свойствами, отличающимися от свойств исходного вещества. Наиболее вероятной причиной изменения свойств являются изменения в кристаллической структуре вещества. Для подтверждения этой гипотезы в Кембриджской базе структурных данных (Cambridge Structural Database, CSD¹) был проведен поиск данных о структуре феназепам, который позволил установить, что база содержит описание только одной кристаллической структуры, названной α -полиморфом феназепам [7].

На основе данной структурной информации с помощью программы MRUA [8] была построена вычисленная рентгеновская дифрактограмма, представленная на рисунке. Рентгеновская дифрактограмма криомодифицированного препарата (рис. 1) существенно отличалась от дифрактограммы исходного α -полиморфа и позволила установить, что модифицированный препарат имеет другую кристаллическую структуру.

Используя методы порошкового рентгеноструктурного анализа [9], удалось установить эту новую структуру на основании полученной дифрактограммы [10]. Новая структура названа β -полиморфом феназепам. Кристаллические структуры α - и β -полиморфов феназепам отличаются только системами слабых межмолекулярных взаимодействий, что приводит к различным системам упаковки молекул в кристаллах и, в конечном итоге, к различиям в некоторых свойствах, например, различным скоростям растворения в жидкостях. Исследование экспериментальной дифрактограммы β -полиморфа также показало присутствие дифракционных пиков α -полиморфа, а последующие расчеты позволили дать количественную оценку его содержания в образце $4,3 \pm 0,3$ %. Повторные рентгеновские измерения этого же образца через год показали, что содержание α -полиморфа в нем увеличилось до $14,5 \pm 0,6$ %. Предположительно, β -полиморф является метастабильной формой феназепам. В результате этой работы способ получения новой полиморфной модификации феназепам был запатентован [11], а кристаллическая структура β -полиморфа включена в Кембриджскую базу CSD.

В настоящее время рентгеновская порошковая дифракция широко используется для установления структурных характеристик новых полиморфных модификаций. Так, были проведены исследования кристаллических структур трех полиморфов препарата тилорон [12] в 2012 году, определение структуры полиморфов фабомотизола [13] и золедроновой кислоты [14] в 2013 году, установление структуры нового полиморфа стероида дегидроэпиандростерона [15] в 2016 году. Способы получения всех вышеперечисленных полиморфов охраняются патентами на изобретение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа опубликованных ранее работ по изучению кристаллических модификаций лекарственных средств на примере феназепам,

¹ <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>

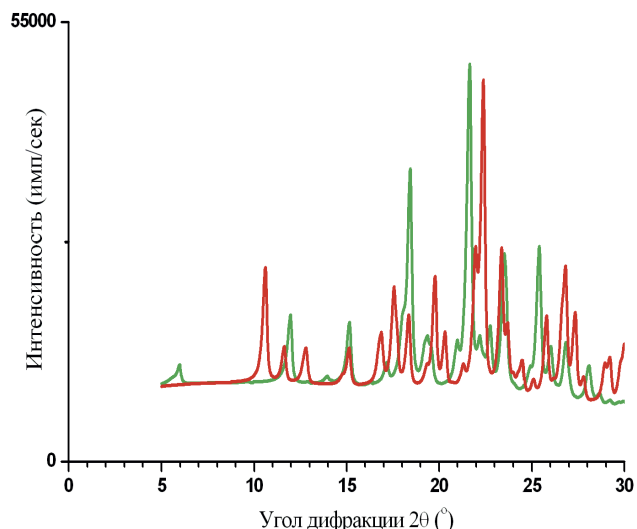


Рис. 1. Рентгеновские дифрактограммы двух полиморфных модификаций феназепам: α -полиморфа [7] (кривая красного цвета) и β -полиморфа [9] (кривая зеленого цвета)

Fig. 1. X-ray diffractograms of two polymorphic forms of phenazepam: α -polymorph [7] (red curve) and β -polymorph [9] (green curve)

тилорона, фабомотизола, золедроновой кислоты и дегидроэпиандростерона обоснована необходимость оценки полиморфизма фармацевтических субстанций при определении их подлинности. Одним из методов, позволяющих качественно и количественно определить различные поликристаллические фазы и их смеси в образце субстанции, является метод рентгеновской порошковой дифрактометрии.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР AAAA-A18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was supported by the FSBI "SCEEMP" of the Ministry of Health of Russia and was carried out as part of a publicly funded research project (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кузьмин ВС, Чернышев ВВ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Рентгеновская порошковая дифрактометрия. Практическое применение в экспертизе лекарственных средств. *Вестник Научного Центра экспертизы средств медицинского применения*. 2015;(2):13–16. [Kuzmin VS, Chernyshev VV, Yashkir VA, Merkulov VA. X-ray powder diffractometry. Practical application in the examination of medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2015;(2):13–6 (In Russ.)]
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. [State pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)]
3. Рудакова ИП, Ильина ИГ, Скачилова СЯ, Мелентьева ТА, Михалев ОВ, Самылина ИА. Полиморфизм и свойства лекарственных средств. *Фармация*. 2009;(8):42–4. [Rudakova IP, Ilyina IG, Skachilova

- va SYa, Melent'eva TA, Mikhalev OV, Samylina IA. The polymorphism and properties of drugs. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2009;(8):42–4 (In Russ.)]
4. Смирнова ИГ, Гильдеева ГН, Чистяков ВВ. Анализ кристаллической и пространственной структуры лекарственных веществ. *Вестник Московского Университета. Серия 2: Химия*. 2012;53(4):234–40. [Smirnova IG, Gildeeva GN, Chistyakov VV. Analysis of crystal and three dimensional structures of drug substances. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2012;67(4):196–201 (In Russ.)]
 5. Демченкова ЕЮ, Чистяков ВВ. Сравнительное изучение качества кристаллических субстанций верапамила. *Биомедицина*. 2006;(5):22–3. [Demchenkova EYu, Chistyakov VV. A comparative study of the quality of crystalline substances Verapamil. *Biomeditsina = Biomedicine*. 2006;(5):22–3 (In Russ.)]
 6. Гильдеева ГН. Полиморфизм: влияние на качество лекарственных средств и актуальные методы анализа. *Качественная клиническая практика*. 2017;(1):56–60. [Gildeeva GN. Polymorphism: influence on the quality of medicines and current methods of analysis. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika = Qualitative Clinical Practice*. 2017;(1):56–60 (In Russ.)]
 7. Карапетян АА, Андрианов ВГ, Стручков ЮТ, Богацкий АВ, Андронати СА, Коротенко ТИ. Кристаллическая и молекулярная структура 7-бром-5-(о-хлорфенил)-1,3-дигидро-2Н-1,4-бензодиазепин-2-она. *Биоорганическая химия*. 1979;5(11):1684–90. [Karapetyan AA, Andrianov VG, Struchkov YuT, Bogatskiy AV, Andronati SA, Korotenko TI. Crystal and molecular structure of 7-bromine-5-(o-chlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepine-2-on. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry*. 1979;5(11):1684–90 (In Russ.)]
 8. Zlokazov VB, Chernyshev VV. MRIA — a program for a full profile analysis of powder multiphase neutron-diffraction time-of-flight (direct and Fourier) spectra. *J Appl Cryst*. 1992;25:447–51. <https://doi.org/10.1107/S0021889891013122>
 9. Чернышев ВВ. Определение кристаллических структур методами порошковой дифракции. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2001;(12):2174–90. [Chernyshev VV. Structure determination from powder diffraction. *Russian Chemical Bulletin. International edition*. 2001;50(12):2273–92] <https://doi.org/10.1023/A:1015006807065>
 10. Sergeev GB, Sergeev BM, Morosov YN, Chernyshev VV. β -Polymorph of phenazepam: a powder study. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online*. 2010;66(Pt 10):o2623. <https://doi.org/10.1107/S1600536810037402>
 11. Морозов ЮН, Сергеев БМ, Колотилов ПН, Шабатин ВП, Сергеев ГБ, Чернышев ВВ и др. Кристаллическая β -модификация 7-бром-1,3-дигидро-5-(2-хлорфенил)-2Н-1,4-бензодиазепин-2-она и способ ее получения. Патент Российской Федерации, № 2430094; 2011. [Morozov YuN, Sergeev BM, Kolotilov PN, Shabatin VP, Sergeev GB, Chernyshev VV, et al. Crystalline β -modification of 7-bromine-1,3-dihydro-5-(2-chlorophenyl)-2H-1,4-benzodiazepine-2-it and the method of its production. Patent of Russian Federation, № 2430094; 2011 (In Russ.)]
 12. Chernyshev VV, Yatsenko AV, Pirogov SV, Nikulenkova TF, Tumanova EV, Lonin IS, et al. Two anhydrous and a trihydrate form of tilorone dihydrochloride: hydrogen-bonding patterns and reversible hydration/dehydration solid-state transformation. *Cryst Growth Des*. 2012;12(12):6118–25. <https://doi.org/10.1021/cg3012475>
 13. Chernyshev VV, Petkune S, Actins A, Auzins R, Davlyatshin DI, Nosyrev PV, et al. Two polymorphs of afobazole from powder diffraction data. *Acta Crystallogr C*. 2013;69(Pt 3):299–302. <https://doi.org/10.1107/S0108270113004502>
 14. Chernyshev VV, Shkavrov SS, Paseshnikchenko KA, Puryaeva TP, Velikodny YA. Zoledronic acid: monoclinic and triclinic polymorphs from powder diffraction data. *Acta Crystallogr C*. 2013;69(Pt 3):263–6. <https://doi.org/10.1107/S0108270113003089>
 15. Chernyshev VV, Morozov YN, Bushmarinov IS, Makoed AA, Sergeev GB. New Polymorph of Dehydroepiandrosterone Obtained via Cryomodification. *Cryst Growth Des*. 2016;16(2):1088–95. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01666>

ОБ АВТОРАХ

Кузьмин Владимир Семенович, д-р хим. наук, ведущий эксперт сектора спектральных методов исследования лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-2533-8142>

Чернышев Владимир Васильевич, д-р физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8514-7471>

Лутцева Анна Ивановна, канд. фарм. наук, начальник Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8752-5245>

AUTHORS

Vladimir S. Kuzmin, Dr. Sci. (Chem.), Leading Expert of the Spectral Methods Sector of the Laboratory of Biotechnological Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-2533-8142>

Vladimir V. Chernyshev, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Leading Research Associate of the Department of Chemistry of M. V. Lomonosov Moscow State University, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8514-7471>

Anna I. Lutseva, Cand. Sci. (Pharm.), Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8752-5245>

Статья поступила 14.03.2018

Принята к печати 22.08.2018

Article was received 14 March 2018

Accepted for publication 22 August 2018



Анализ результатов использования amino-, амидных и нитрильных сорбентов в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий

А. С. Осипов, О. А. Попова*, С. Г. Ларионова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. Обобщены результаты работ, выполненных в 2013–2017 гг. по исследованиям в области жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. На основании анализа результатов, полученных при разделении ряда модельных смесей соединений различной природы, сравнивали свойства хроматографических колонок с amino-, амидными и нитрильными сорбентами. Установлено, что хроматографические колонки с аминсорбентами могут быть использованы для анализа как гидрофильных, так и некоторых гидрофобных соединений, содержащих кислотные (4-гидроксибензойная кислота) или потенциально кислотные группировки (нитрогруппы в нитросоединениях; фенольные гидроксильные группы в изомерах бутилгидроксианизола и парабенах). Показано, что хроматографические колонки с нитрильными и амидными сорбентами обладают сходными между собой свойствами, применимы для анализа гидрофильных соединений (гидроксикарбамид) и координационных соединений платины и не применимы для изомеров бутилгидроксианизола, эфиров пара-гидроксибензойной кислоты и нитроэфиров изосорбида. Сделаны предположения о вероятных механизмах взаимодействия анализируемых соединений с сорбентами. Сделан вывод, что увеличение содержания ацетонитрила в подвижных фазах, сопровождающееся увеличением времени удерживания анализируемых соединений и улучшением разрешения между их пиками, свидетельствует о механизме жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий; нитрильные сорбенты; амидные сорбенты; аминсорбенты; хроматографическая колонка

Для цитирования: Осипов АС, Попова ОА, Ларионова СГ. Анализ результатов использования amino-, амидных и нитрильных сорбентов в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):162–170. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-162-170>

***Контактное лицо:** Попова Ольга Анатольевна; PopovaOA@expmed.ru

Analysis of the Results of Using Amino, Amide and Nitrile Sorbents in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

A. S. Osipov, O. A. Popova*, S. G. Larionova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The article summarises the results of studies of hydrophilic interaction liquid chromatography performed from 2013 until 2017. The analysis of results obtained during separation of a number of model mixtures of compounds having different nature helped to compare the characteristics of columns packed with amino, amide and nitrile sorbents. It was demonstrated that columns packed with amino sorbents could be used for the analysis of both hydrophilic compounds and some hydrophobic compounds containing acidic (4-hydroxybenzoic acid) and potentially acidic groups (nitro groups of nitro compounds; phenolic hydroxyl groups of butylhydroxyanisole isomers and parabens). It was discovered that chromatographic columns packed with nitrile and amide sorbents have common properties and can be used for the analysis of hydrophilic compounds (hydroxycarbamide) and platinum coordination compounds, but cannot be used for the analysis of butylhydroxyanisole isomers, esters of p-hydroxybenzoic acid and nitrate esters of isosorbide. The article offers hypotheses about possible mechanisms of interaction between test substances and sorbents. It was concluded that the increase in the acetonitrile content in mobile phases, which increases the retention time of the test substances and results in better resolution between their peaks, illustrates the mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography.

Key words: high-performance liquid chromatography; hydrophilic interaction liquid chromatography; nitrile sorbents; amide sorbents; amino sorbents; chromatographic column

For citation: Osipov AS, Popova OA, Larionova SG. Analysis of the results of using amino, amide and nitrile sorbents in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*=*The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(3):162–170. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-162-170>

***Corresponding author:** Olga A. Popova; PopovaOA@expmed.ru

Жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)) — альтернативный метод разделения многих типов полярных и гидрофильных соединений. Данный метод характеризуется нормально-фазовым механизмом разделения, но с использованием обращенно-фазовых растворителей и буферных растворов (ацетонитрил, преимущественно в высоких концентрациях, растворы ацетата аммония, формиата аммония). При необычных условиях хроматографирования (очень большое содержание ацетонитрила в подвижной фазе, свыше 98–99 %) возможно разделение и некоторых гидрофобных соединений. Ранее проведено сравнение свойств хроматографических колонок с amino- и нитрильными сорбентами в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [1]. Свойства этих двух типов хроматографических колонок существенно отличаются.

Цель работы — выявление общих закономерностей, характерных для жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий, на основании анализа результатов, накопленных при разделении смесей соединений различной природы на колонках с amino-, амидными и нитрильными сорбентами.

Обзор составлен по результатам работ, проводившихся в 2013–2017 гг. в Испытательном центре экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Анализируемые вещества были представлены следующими группами соединений: гидроксикарбамид и мочевины; координационные соединения платины (II); изомеры бутилгидроксианизола; эфиры пара-гидроксibenзойной кислоты; нитроэфиры изосорбида.

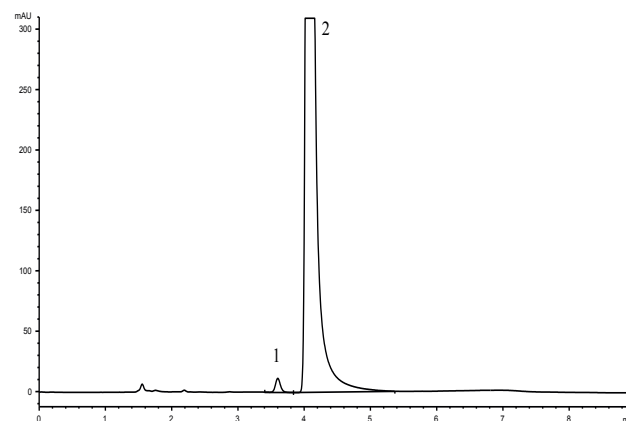
Собранные хроматографические данные были получены на колонках Zorbax NH_2 150×4,6 мм (5 мкм), Zorbax SB CN 150×4,6 мм (5 мкм), Nova Pak CN HP 150×3,9 мм (4 мкм), Zorbax XDB CN 150×4,6 мм (5 мкм), XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм) и Chromolith SpeedROD RP-18e 50×4,6 мм. Условия хроматографирования приведены в подписях к рисункам.

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ГИДРОКСИКАРБАМИДА

Гидроксимочевина (название по Фармакопее США), или гидроксикарбамид (название соединения по Европейской фармакопее), применяется в медицинской практике в качестве противоопухолевого средства. Согласно действующей нормативной документации производителей в препаратах гидроксикарбамида контролируется содержание примеси — мочевины. Для этой цели применяют методику Европейской фармакопеи (ТСХ на пластинках с силикагелем; подвижная фаза — смесь пиридина, воды и этилацетата (2:2:10)) либо методику Британской фармакопеи (ТСХ на пластинках с целлюлозой F; подвижная фаза — смесь уксусной кислоты, воды и бутанола-1 (1:1:4)) [2, 3]. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

для разделения гидроксикарбамида и мочевины в зарубежных фармакопеях не описан. Необходимо отметить, что в условиях обращенно-фазовой хроматографии гидроксикарбамид и мочевины не разделяются.

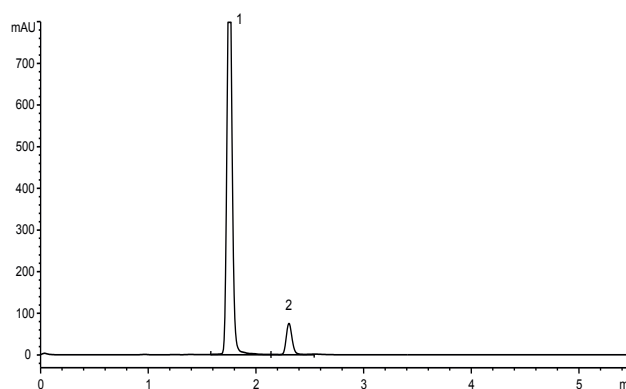
На хроматографических колонках с нитрильными, amino- и амидными сорбентами гидроксикарбамид и мочевины разделяются в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаи-



1 — мочевины, 2 — гидроксикарбамид. 1 — urea, 2 — hydroxycarbamide

Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси препарата гидроксикарбамид, капсулы и стандартного образца мочевины [4]
Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (90:10); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование 200 нм

Fig. 1. Chromatogram of the model mixture of hydroxycarbamide capsules and urea reference standard [4]
Test conditions: column — Zorbax NH_2 150×4.6 mm (5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (90:10); flow rate — 1 ml/min; detection at 200 nm

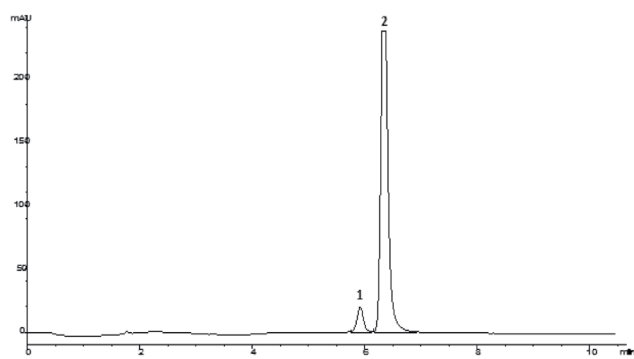


1 — гидроксикарбамид, 2 — мочевины. 1 — hydroxycarbamide, 2 — urea

Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси препарата гидроксикарбамид, капсулы и стандартного образца мочевины [5]
Условия анализа: колонка Zorbax SB CN 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (93:7); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование 200 нм

Fig. 2. Chromatogram of the model mixture of hydroxycarbamide capsules and urea reference standard [5]
Test conditions: column — Zorbax SB CN 150×4.6 mm (5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (93:7); flow rate — 1 ml/min; detection at 200 nm

модействий при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 90–95 % [4, 5]. С увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе увеличиваются времена удерживания мочевины и гидроксикарбамида, а также улучшается разрешение их пиков; данный факт указывает на то, что на этих колонках имеет место нормально-фазовый механизм разделения в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. Следует от-

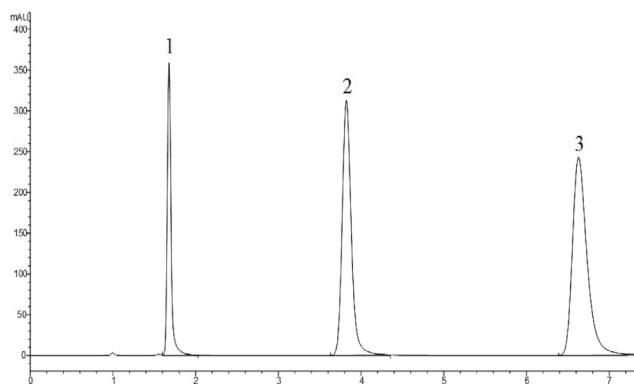


1 — мочевина, 2 — гидроксикарбамид. 1 — urea, 2 — hydroxycarbamide

Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси препарата гидроксикарбамид, капсулы и стандартного образца мочевины [4]
Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (93:7); скорость потока — 1 мл/мин; детектирование 200 нм

Fig. 3. Chromatogram of the model mixture of hydroxycarbamide capsules and urea reference standard [4]

Test conditions: column — XBridge Amide 150×4.6 mm (3.5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (93:7); flow rate — 1 ml/min; detection at 200 nm



1 — цисплатин, 2 — оксалиплатин, 3 — карбоплатин
1 — cisplatin, 2 — oxaliplatin, 3 — carboplatin

Рис. 4. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов координационных соединений платины [12]

Условия анализа: колонка Nova-Pak CN HP 150×3,9 мм (4 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (95:5); скорость потока — 0,72 мл/мин; детектирование при 220 нм

Fig. 4. Chromatogram of the model mixture of platinum coordination compounds [12]

Test conditions: column — Nova-Pak CN HP 150×3.9 mm (4 μm); mobile phase — acetonitrile–water (95:5); flow rate — 0.72 ml/min; detection at 220 nm

метить, что на нитрильной колонке Zorbax SB CN мочевины элюируется после карбамида, а на аминоклонке Zorbax NH₂ и амидной колонке XBridge Amide мочевины элюируется до гидроксикарбамида (рис. 1–3).

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ

Координационные соединения платины (II), такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин, также применяют в качестве противоопухолевых средств. Контроль качества этих препаратов проводят методами обращенно-фазовой и ион-парной хроматографии на колонках с сорбентами C18 и C8. При этом содержание ацетонитрила в подвижных фазах варьирует от 1–2 % (обращенно-фазовая хроматография) до 10–20 % (варианты ион-парной хроматографии). Для определения посторонних примесей в цисплатине используют хроматографию на ионообменных колонках [6, 7].

В Британской фармакопее [8] для количественного определения цисплатина на колонке Lichrosorb NH₂ приведена подвижная фаза: ацетонитрил–вода (90:10). Для анализа субстанции и лекарственной формы карбоплатина [9, 10] применяют аналогичного типа хроматографические колонки и подвижную фазу: ацетонитрил–вода (87:13). Следует отметить, что при анализе координационных соединений платины на аминсорбентах имеет место механизм разделения, соответствующий жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Порядок элюирования компонентов анализируемой смеси на колонках с аминсорбентами аналогичен порядку их элюирования на диольной колонке Nucleosil 100-5 OH [11], а также на колонке с нитрильным сорбентом Nova-Pak CN HP [12] и колонке с амидным сорбентом XBridge Amide [13]. На этих колонках было достигнуто лучшее разрешение анализируемых соединений (рис. 4, 5).

Разделение компонентов анализируемой смеси на колонках Nova-Pak CN HP и XBridge Amide возможно как в условиях обращенно-фазовой хроматографии (содержание ацетонитрила в подвижной фазе 2–5 %), так и в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий (содержание ацетонитрила 80–90 %). Следует отметить, что при переходе от хроматографии гидрофильных взаимодействий к обращенно-фазовой хроматографии изменяется очередность элюирования оксалиплатина и карбоплатина (рис. 5 и 6).

Разрешение между пиками координационных соединений платины в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий выше, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии.

В процессе хроматографирования в условиях гидрофильных взаимодействий разделение анализируемых соединений осуществляется за счет различия в образовании и разрыве координационных связей между атомом платины соединения и амино-, амидными-, цианогруппами и диольными

группами сорбентов хроматографических колонок. В целом, колонки с нитрильными, диольными, amino- и с амидными сорбентами при анализе координационных соединений платины обладают сходными свойствами.

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ ИЗОМЕРОВ БУТИЛГИДРОКСИАНИЗОЛА

Бутилгидроксианизол (БГА) применяют в качестве антиоксиданта для предотвращения окисления нестабильных лекарственных препаратов. БГА описан в Европейской фармакопее и в Фармакопее США [14, 15]. В Европейской фармакопее указано, что основным антиоксидантом является 2-БГА изомер (2-(1,1-диметилэтил)-4-метоксифенол), а в качестве примеси нормируется содержание 3-БГА изомера (3-(1,1-диметилэтил)-4-метоксифенол). В Фармакопее США содержание 3-БГА изомера не регламентировано. Под количественным содержанием принимают сумму 2- и 3-изомеров БГА. Анализ проводят на хроматографической колонке C18 в условиях обращенно-фазовой хроматографии [15]. В условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 98 % изомеры БГА разделяются на колонке аминсорбентом Zorbax NH₂ [16]. Причем примесь 3-изомера БГА элюируется после основного пика 2-изомера БГА (рис. 7).

При хроматографировании анализируемых соединений на амидной колонке XBridge Amide примесь 3-изомера БГА элюируется до основного пика 2-изомера БГА, и возможно разделение лишь изомеров БГА [17], без присутствия в анализируемой смеси другого антиоксиданта бутилгидрокситолуола (БГТ). Так, при хроматографировании на данной колонке смеси антиоксидантов время удерживания 3-изомера БГА и БГТ одинаковое — 1,97 мин (подвижная фаза ацетонитрил–вода (99,5:0,5)).

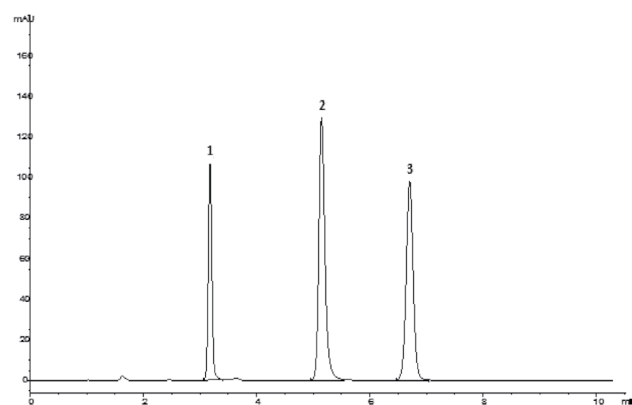
На колонках с нитрильными сорбентами не происходит разделение изомеров БГА ни в условиях обращенно-фазовой хроматографии (при содержании ацетонитрила или метанола в подвижной фазе 20–45 %), ни в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (при содержании ацетонитрила в подвижной фазе свыше 95 %) [16].

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ГОМОЛОГИЧЕСКОГО РЯДА ПАРАБЕНОВ

Эфиры пара-гидроксibenзойной кислоты (название соединений по Европейской фармакопее), или парабены (название соединений по Фармакопее США) из-за присущей им антимикробной активности применяются в качестве консервантов при производстве лекарственных средств. Условия хроматографирования парабенов по методикам Европейской фармакопеи и Фармакопеи США совпадают [18, 19]. Анализ согласно указанным монографиям проводится методом обращенно-фазовой хроматографии на колонках C18 150×4,6 мм (5 мкм)

с подвижной фазой водный раствор 6,8 г/л КН₂РO₄–метанол (35:65).

Из-за присутствия фенольных гидроксильных групп в молекулах анализируемых соединений можно ожидать схожести поведения парабенов и антиоксиданта БГА на колонках с иными типами сорбентов в условиях жидкостной хроматографии



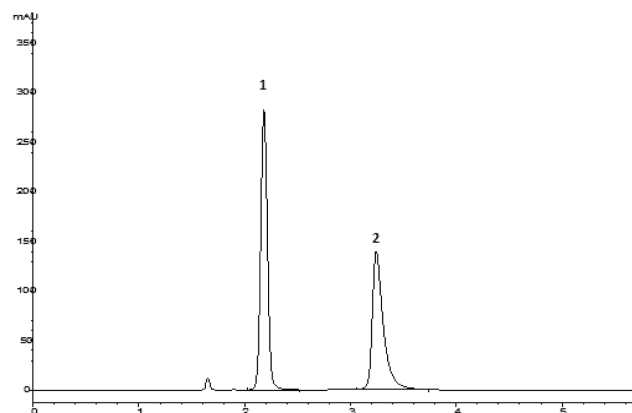
1 — цисплатин, 2 — оксалиплатин, 3 — карбоплатин
1 — cisplatin, 2 — oxaliplatin, 3 — carboplatin

Рис. 5. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов координационных соединений платины [13]

Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (85:15); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 220 нм

Fig. 5. Chromatogram of the model mixture of platinum coordination compounds [13]

Test conditions: column — XBridge Amide 150×4.6 mm (3.5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (85:15); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 220 nm



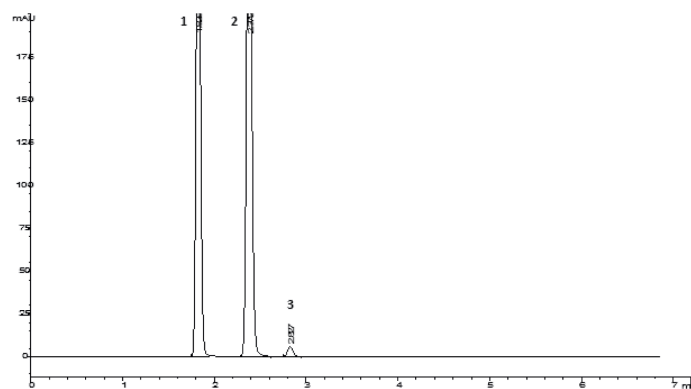
1 — смесь цисплатина с карбоплатином, 2 — оксалиплатин
1 — mixture of cisplatin and carboplatin, 2 — oxaliplatin

Рис. 6. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов координационных соединений платины [13]

Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (2:98); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 220 нм

Fig. 6. Chromatogram of the model mixture of platinum coordination compounds [13]

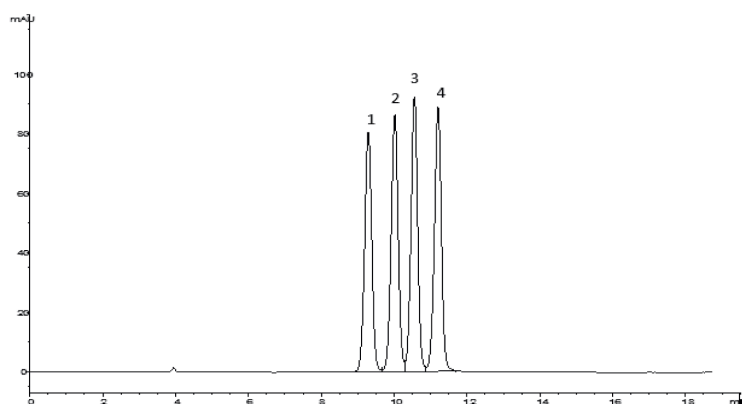
Test conditions: column — XBridge Amide 150×4.6 mm (3.5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (2:98); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 220 nm



1 — бутилгидрокситолуол (БГТ), 2 — 2-изомер бутилгидроксианизола (2-БГА), 3 — 3-изомер бутилгидроксианизола (3-БГА)
1 — butylhydroxytoluene (BHT), 2 — 2-isomer of butylhydroxyanisole (2-BHA), 3 — 3-isomer of butylhydroxyanisole (3-BHA)

Рис. 7. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов БГА и БГТ [17]. Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил—вода (99,5:0,5); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 280 нм

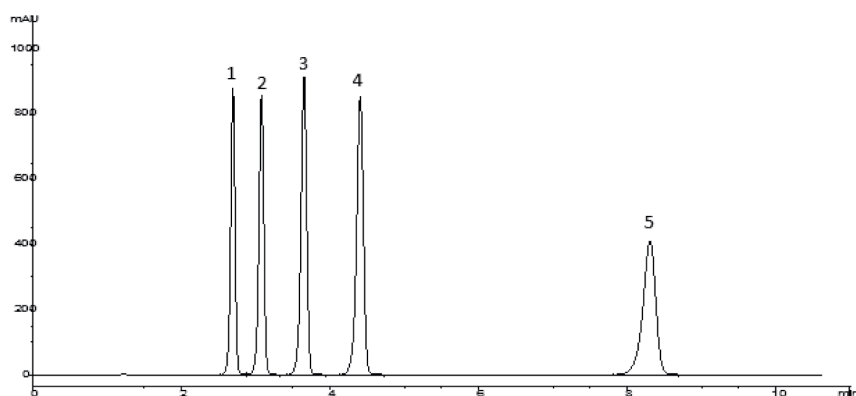
Fig. 7. Chromatogram of the model mixture of BHT and BHA reference standards [17]. Test conditions: column — Zorbax NH_2 150×4.6 mm (5 μ m); mobile phase — acetonitrile—water (99.5:0.5); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 280 nm



1 — н-гептилпарабен, 2 — бутилпарабен, 3 — этилпарабен, 4 — метилпарабен
1 — n-heptylparaben, 2 — butylparaben, 3 — ethylparaben, 4 — methylparaben

Рис. 8. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов парабенов [20]. Условия анализа: колонка Zorbax NH_2 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил—водный раствор 2 мМ KH_2PO_4 (98:2); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 260 нм

Fig. 8. Chromatogram of the model mixture of reference standards of parabens [20]. Test conditions: column — Zorbax NH_2 150×4.6 mm (5 μ m); mobile phase — acetonitrile—water solution 2 mM KH_2PO_4 (98:2); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 260 nm



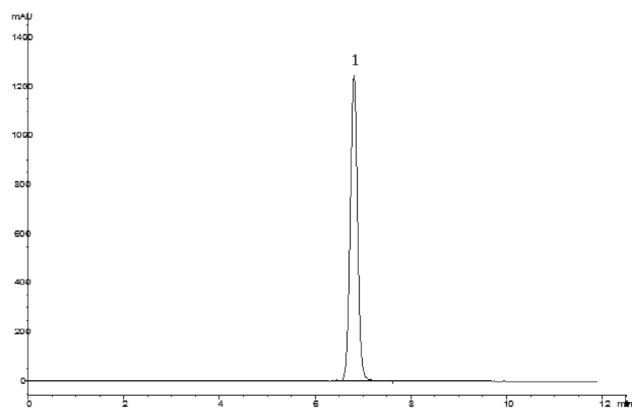
1 — метилпарабен, 2 — этилпарабен, 3 — пропилпарабен, 4 — бутилпарабен, 5 — н-гептилпарабен
1 — methylparaben, 2 — ethylparaben, 3 — propylparaben, 4 — butylparaben, 5 — n-heptylparaben

Рис. 9. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов парабенов [25]. Условия анализа: колонка Zorbax XDB CN 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил—вода (40:60); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 260 нм

Fig. 9. Chromatogram of the model mixture of reference standards of parabens [25]. Test conditions: column — Zorbax XDB CN 150×4.6 mm (5 μ m); mobile phase — acetonitrile—water (40:60); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 260 nm

гидрофильных взаимодействий. На рисунке 8 приведена хроматограмма разделения модельной смеси парабонов на колонке Zorbax NH₂, при этом меняется очередность элюирования анализируемых соединений по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией [20].

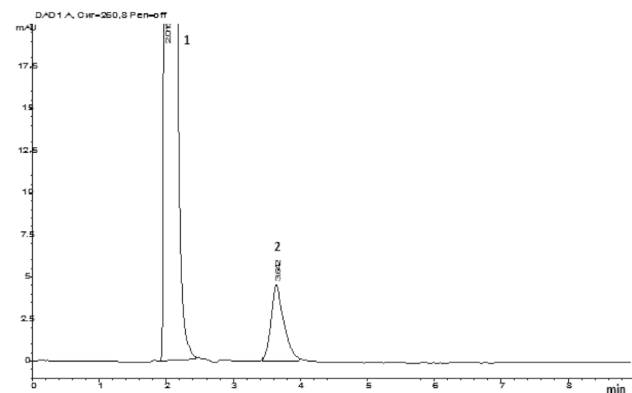
Следует отметить, что разрешение между пиками парабонов на колонках с аминсорбентами в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных



1 — 4-гидроксibenзойная кислота. 1 — 4-hydroxybenzoic acid

Рис. 10. Хроматограмма стандартного образца 4-гидроксibenзойной кислоты [25]. Условия анализа: колонка Zorbax NH₂ 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил—1 % уксусная кислота в воде (80:20); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование 260 нм

Fig. 10. Chromatogram of 4-hydroxybenzoic acid reference standard [25]. Test conditions: column — Zorbax NH₂ 150×4.6 mm (5 μm); mobile phase — acetonitrile—1 % acetic acid in water (80:20); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 260 nm



1 — смесь метил-, этил-, пропил- и бутилпарабонов, 2 — 4-гидроксibenзойная кислота
1 — mixture of methyl-, ethyl-, propyl-, and butylparabens, 2 — 4-hydroxybenzoic acid

Рис. 11. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов парабонов и 4-гидроксibenзойной кислоты [20]. Условия анализа: колонка XBridge Amide 150×4,6 мм (3,5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил—вода (97:3); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 260 нм

Fig. 11. Chromatogram of the model mixture of paraben and 4-hydroxybenzoic acid reference standards [20]. Test conditions: column — XBridge Amide 150×4.6 mm (3.5 μm); mobile phase — acetonitrile—water (97:3); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 260 nm

взаимодействий ниже, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии (рис. 9).

На колонке с амидным сорбентом XBridge Amide парабоны практически не могут быть разделены в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [21]. В отличие от аминогрупп нитрильные и амидные группы не обладают сродством к фенольным гидроксильным группам парабонов. Хроматографические колонки с амино- и амидными сорбентами могут быть применены для определения примеси в парабенах 4-гидроксibenзойной кислоты в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (рис. 10, 11).

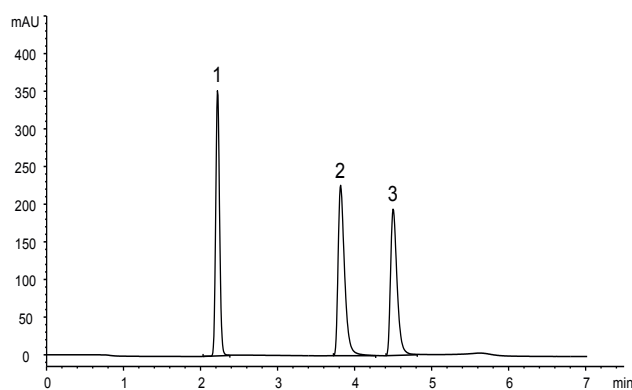
При определении 4-гидроксibenзойной кислоты проявляется отличие в свойствах хроматографических колонок с амино- и амидными сорбентами. Аминсорбент Zorbax NH₂ представляет собой ионообменник, и для элюирования 4-гидроксibenзойной кислоты с колонки необходимо применять подвижные фазы, содержащие 20–30 водных частей 1 % уксусной кислоты. Уксусная кислота вытесняет 4-гидроксibenзойную кислоту с аминогрупп сорбента. Амидный сорбент XBridge Amide не обладает ионообменными свойствами, для элюирования 4-гидроксibenзойной кислоты в составе подвижной фазы достаточно только 1–2 % воды [25].

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА НИТРАТОВ ИЗОСОРБИДА

Лекарственные средства, содержащие нитроэфиры изосорбида и применяемые в кардиологической практике, представлены в настоящее время препаратами изосорбида динитрата (ИСДН) и изосорбида 5-мононитрата (ИСМН). Действующим веществом ИСМН является 5-нитро изомер ИСМН (5-изомер ИСМН). Содержание примеси 2-нитро изомера ИСМН (2-изомер ИСМН), а также ИСДН контролируется в субстанции и лекарственных препаратах ИСМН [21, 22].

Для анализа ИСМН и ИСДН наряду с нормально-фазовой хроматографией применяют обращенно-фазовую хроматографию. Кроме этого, на колонках с аминсорбентами нитраты изосорбида уверенно разделяются в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [23]. Следует также отметить, что с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе увеличивается разрешение между пиками ИСДН и изомеров ИСМН. По сравнению с обращенно-фазовой хроматографией на колонках C18 (подвижные фазы: смеси метанол—вода или ацетонитрил—вода) меняется очередность элюирования ИСДН и 5-изомера ИСМН. Однако последовательность элюирования 2-изомера и 5-изомера ИСМН остается той же, что и для обращенно-фазовой хроматографии (рис. 12, 13).

Необходимо также отметить, что даже при применении подвижной фазы ацетонитрил—вода (99:1) ИСДН и изомеры ИСМН не разделяются и элюируются с колонки Zorbax SB CN одним пиком (1,69 мин). Аналогично невозможно разделить ИСДН и изомеры ИСМН на амидной колон-



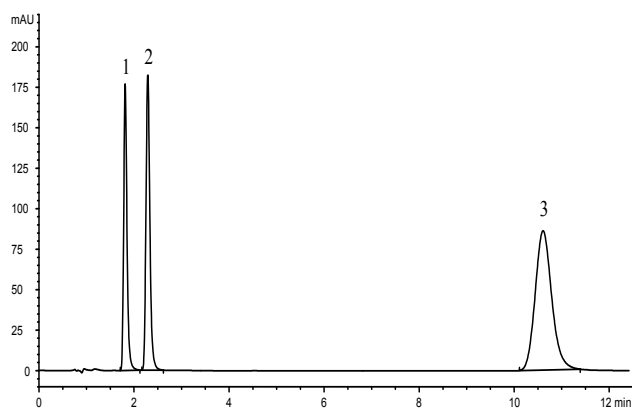
1 — изосорбида динитрат, 2 — 2-изомер изосорбида мононитрата, 3 — 5-изомер изосорбида мононитрата
1 — isosorbide dinitrate, 2 — 2-isomer of isosorbide mononitrate, 3 — 5-isomer of isosorbide mononitrate

Рис. 12. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов изосорбида динитрата и изомеров изосорбида мононитрата [23]

Условия анализа: колонка Zorbax NH₂ 150×4,6 мм, (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил–вода (99,5:0,5); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование 210 нм

Fig. 12. Chromatogram of the model mixture of isosorbide dinitrate and isomers of isosorbide mononitrate reference standards [23]

Test conditions: column — Zorbax NH₂ 150×4.6 mm (5 μm); mobile phase — acetonitrile–water (99.5:0.5); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 210 nm



1 — 2-изомер изосорбида мононитрата, 2 — 5-изомер изосорбида мононитрата, 3 — изосорбида динитрат
1 — 2-isomer of isosorbide mononitrate, 2 — 5-isomer of isosorbide mononitrate, 3 — isosorbide dinitrate

Рис. 13. Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов и изомеров изосорбида мононитрата и изосорбида динитрата [24]

Условия анализа: колонка Chromolith SpeedROD RP-18e 50×4,6 мм; подвижная фаза: метанол–вода (10:90); скорость потока — 1,0 мл/мин; детектирование при 210 нм

Fig. 13. Chromatogram of the model mixture of isomers of isosorbide mononitrate and isosorbide dinitrate reference standards [24]

Test conditions: column — Chromolith SpeedROD RP-18e 50×4.6 mm; mobile phase — methanol–water (10:90); flow rate — 1.0 ml/min; detection at 210 nm

ке XBridge Amide [17]. В отличие от аминогрупп нитрильные и амидные группы не обладают сродством к нитро- и гидроксильным группам этих со-

единений в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на накопленных за период 2013–2017 гг. данных, следует отметить, что если с увеличением содержания ацетонитрила в подвижных фазах резко увеличивается время удерживания анализируемых соединений и улучшается разрешение между их пиками — это свидетельствует о механизме жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. В условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий свойства колонок с аминсорбентами отличаются от колонок с нитрильными и амидными сорбентами. Хроматографические колонки с аминсорбентами могут быть применены для анализа как гидрофильных соединений, так и некоторых гидрофобных соединений, содержащих кислотные или потенциально кислотные группировки (нитросоединения, бутилгидроксианизол, парабыны). В результате исследований было установлено, что хроматографические колонки с нитрильными и амидными сорбентами, из всех рассмотренных в работе групп соединений, применимы только для анализа гидрофильных соединений (гидроксикарбамид) и координационных соединений платины.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed with no external funding.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Осипов АС, Попова ОА, Грецкая ТН, Сулименкова АИ, Нездольева МВ. Применение колонок с амино- и нитрильными сорбентами в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;(1):9–14. [Osipov AS, Popova OA, Grets-kaya TN, Sulimenkova AI, Nezdolievva MV. Use of columns with amine and nitrile sorbents for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;(1):9–14 (In Russ.)]
- Monograph: Hydroxycarbamide Capsules. British Pharmacopoeia 2013. London: Stationery Office; 2012.
- Monograph: Hydroxycarbamide. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
- Осипов АС, Нечаева ЕБ, Победин ОА. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа гидроксикарбамида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;(2):140–4. [Osipov AS, Nechaeva EB, Pobedin OA. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography for the analysis hydroxycarbamide. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration*. 2015;(2):140–4 (In Russ.)]
- Осипов АС, Нечаева ЕБ, Трухачева ЛА. Применение хроматографической колонки с нитрильным сорбентом для анализа гидроксикарбамида методом ВЭЖХ. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(3):58–61. [Osipov AS, Nechaeva EB, Truhacheva LA. Application of a chromatographic column with a nitrile sorbent for hplc analysis hydroxycarbamide. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsin-*

- skogo primeneniya = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(3):58–61 (In Russ.)]
6. Monograph: Cisplatin for Injection. United State Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017.
 7. Monograph: Cisplatin. Japanese Pharmacopoeia. 16th ed. Tokyo; 2011.
 8. Monograph: Cisplatin Injection. British Pharmacopoeia 2013. London: Stationery Office; 2012.
 9. Monograph: Carboplatin. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
 10. Monograph: Carboplatin for Injection. United State Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017.
 11. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Победин ОА. Применение хроматографической колонки с диольным сорбентом для анализа координационных соединений платины. *Химико-фармацевтический журнал*. 2013;47(6):51–3. [Osipov AS, Nechaeva EB, Pobedin OA. Application of a chromatographic column with a diol sorbent for the analysis of platinum coordination compounds. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharm Chem J*. 2013;47(6):337–9]
 12. Осипов АС, Нечаева ЕБ. Применение хроматографических колонок с нитрильными и фенильными сорбентами для анализа координационных соединений платины. *Химико-фармацевтический журнал*. 2014;48(8):45–8. [Osipov AS, Nechaeva EB. Application of chromatographic columns with nitrile and phenyl sorbents to the analysis of platinum coordination compounds. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharm Chem J*. 2014;48(8):548–51]
 13. Осипов АС, Попова ОА, Рослякова НВ, Кожемякина ЛЛ. Применение хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа координационных соединений платины. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):152–5. [Osipov AS, Popova OA, Roslyakova NV, Koshimaykina LL. The use of an amide sorbent chromatographic column for analysis of platinum coordination compounds. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration*. 2017;(2):152–5 (In Russ.)]
 14. Monograph: Butylated Hydroxyanisole. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
 15. Monograph: Butylated Hydroxyanisole. United State Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017.
 16. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Миронова ММ, Ковалева ЕЛ. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения изомеров бутилгидроксанизола. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(3):50–2. [Osipov AS, Nechaeva EB, Mironova MM, Kovaleva EL. Use of hydrophilic interaction liquid chromatography to separate butylhydroxyanisole isomers. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharm Chem J*. 2015;49(3):203–5]
 17. Осипов АС, Попова ОА, Ларионова СГ, Греция ТН, Милкина СЕ. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения позиционных изомеров бутилгидроксанизола и изосорбида мононитрата. *Фармация*. 2017;66(5):14–8. [Osipov AS, Popova OA, Larionova SG, Gretskeya TN, Milkina SE. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation of positional isomers butylhydroxyanisole and isosorbide mononitrate. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2017;66(5):14–8 (In Russ.)]
 18. Monograph: Methyl parahydroxybenzoate. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.
 19. Monograph: Methylparaben Sodium. United States Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017.
 20. Осипов АС, Попова ОА, Милкина СЕ, Греция ТН, Сулименкова АИ. Применение хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа парабенов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(1):56–60. [Osipov AS, Popova OA, Milkina SE, Gretskeya TN, Sulimenkova AI. The use of a chromatographic column packed with amide sorbent for the analysis of parabens. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(1):56–60 (In Russ.)]
 21. Monograph: Diluted Isosorbide Mononitrate. United States Pharmacopoeia. 40th ed. USP 40-NF 35; 2017.
 22. Monograph: Isosorbide Mononitrate Tablets. British Pharmacopoeia 2013. London: Stationery Office; 2012.
 23. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Трухачева ЛА. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа органических нитратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(3):108–11. [Osipov AS, Nechaeva EB, Truhacheva LA. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography for analysis of organic nitrates. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration*. 2016;(3):108–11 (In Russ.)]
 24. Осипов АС, Нечаева ЕБ, Орлов ЕН. Применение монолитной колонки Chromolith SpeedROD RP-18e для разделения нитратов изосорбида. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2012;(8):20–3. [Osipov AS, Nechaeva EB, Orlov EN. Application of monolithic column Chromolith SpeedROD RP-18e for separate isosorbide nitrates. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2012;(8):20–3 (In Russ.)]
 25. Осипов АС, Попова ОА, Сулименкова АИ, Нездольева МВ. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа парабенов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(1):104–7. [Osipov AS, Popova OA, Sulimenkova AI, Nezdolievya MV. Application of hydrophilic interactions liquid chromatography for parabens analysis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration*. 2017;(1):104–7 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ

Осипов Алексей Сергеевич, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Попова Ольга Анатольевна, начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2933-5632>

Ларионова Святлана Геннадьевна, канд. фарм. наук, главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1891-3567>

AUTHORS

Alexey S. Osipov, Cand. Sci. (Biol.), chief expert of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia

Olga A. Popova, Head of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2933-5632>

Svetlana G. Larionova, Cand. Sci. (Pharm.), chief expert of the Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Preparations No. 2 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1891-3567>

Статья поступила 23.01.2018
Принята к печати 22.08.2018

Article was received 23 January 2018
Accepted for publication 22 August 2018

Современные требования к качеству лекарственных средств растительного происхождения

Е. И. Саканян, Е. Л. Ковалева, Л. Н. Фролова*, В. В. Шелестова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. В статье приведены результаты сравнительного анализа требований Государственной фармакопеи СССР XI издания (ГФ XI) и Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания (ГФ XIII), регламентирующих оценку качества и стандартизацию лекарственного растительного сырья (ЛРС), лекарственных растительных препаратов (ЛРП) и других средств растительного происхождения. Рассмотрены требования к критериям оценки качества ЛРС и ЛРП в общих и частных фармакопейных статьях, действовавших ранее в Российской Федерации и во вновь введенных. Описаны новые виды ЛРС, впервые включенные в Государственную фармакопею, а также виды ЛРС, содержащиеся в Государственной фармакопее СССР X издания, но не вошедшие в ГФ XI и включенные в ГФ XIII. Проведен анализ требований общих фармакопейных статей, впервые включенных в ГФ XIII: «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения», «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», «Определение коэффициента водопоглощения лекарственного растительного сырья», «Почки», «Гранулы резано-прессованные». Определены направления совершенствования методов фармакопейного анализа с учетом современных достижений и повышения требований к качеству лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов.

Ключевые слова: Государственная фармакопея; лекарственное растительное сырье; лекарственные растительные препараты; показатели качества; стандартизация; методы анализа; биологически активные вещества; фармакопейная статья; общая фармакопейная статья

Для цитирования: Саканян ЕИ, Ковалева ЕЛ, Фролова ЛН, Шелестова ВВ. Современные требования к качеству лекарственных средств растительного происхождения. *Ведомости Научного Центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):170–178. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-170-178>

***Контактное лицо:** Фролова Лариса Николаевна; Frolova@expmed.ru

Current Requirements for the Quality of Herbal Medicinal Products

E. I. Sakanyan, E. L. Kovaleva, L. N. Frolova*, V. V. Shelestova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The article provides the results of a comparative analysis of requirements laid out in the State Pharmacopoeia of the USSR, XI ed. (SPh XI) and the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII ed. (SPh XIII) concerning quality evaluation and standardization of herbal substances, herbal medicines and other herbal products. The article discusses requirements for the criteria of herbal substances and herbal medicines quality control described in general chapters and monographs that were previously in force and that have recently been adopted. The article mentions new herbal substances that were included into the State Pharmacopoeia of the Russian Federation for the first time as well as herbal substances included into the State Pharmacopoeia of the USSR, X ed., not included into SPh XI, but included into SPh XIII. The article analyses the requirements described in the new general chapters that were recently included into SPh XIII: “Herbal substances. Herbal preparations”, “Determination of heavy metals and arsenic content in herbal substances and herbal medicinal products”, “Determination of water absorption factor for herbal substances”, “Buds”, “Cut-pressed granules”. The article suggests ways to improve methods of analysis of herbal substances and herbal medicinal products in view of recent advances in pharmacopoeial analysis and the increasing requirements for its quality.

Key words: State pharmacopoeia; herbal substances; herbal medicinal products; quality parameters; standardization; methods of analysis; biologically active substances; monograph; general chapter

For citation: Sakanyan EI, Kovaleva EL, Frolova LN, Shelestova VV. Current requirements for the quality of herbal medicinal products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(3):170–178. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-170-178>

***Corresponding author:** Larisa N. Frolova; Frolova@expmed.ru

В Российской Федерации (РФ) с 2009 года действует Федеральная целевая программа «Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года», которая, в том числе, предусматривает необходимость «модернизации и утверждения Фармакопеи РФ, гармонизированной с Европейской фармакопеей» [1].

Требования Государственной фармакопеи СССР XI издания (ГФ XI) для своего времени были достаточно высокого уровня [2]. Но со временем многие статьи и методы анализа этой фармакопеи устарели [3, 4]. С 1 января 2016 года приказом Минздрава России № 771 от 29 октября 2015 г. «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей» введена в действие Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания (ГФ XIII) [5].

Цель работы — сравнительный анализ требований к стандартизации лекарственного растительного сырья, лекарственных растительных препаратов и других лекарственных средств растительного происхождения ГФ XI и ГФ XIII.

Информационно-аналитическое исследование общих и частных фармакопейных статей ГФ XI и ГФ XIII позволило установить следующее. В ГФ XI требования к качеству ЛРС изложены в 24 общих фармакопейных статьях (ОФС) [6–9], из которых девять посвящены методам анализа ЛРС [8], семь ОФС — методам диагностики отдельных морфологических групп ЛРС («Листья», «Травы», «Цветки», «Плоды», «Семена», «Кора», «Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы» [8]), четыре ОФС — лекарственным формам из ЛРС («Настои и отвары» [9], «Настойки» [9], «Экстракты» [9], «Сборы» [8]) и по одной ОФС — лекарственным средствам растительного происхождения («Эфирные масла» [8]), упаковке, маркировке и транспортированию ЛРС [9], хранению ЛРС [8], правилам приемки и методам отбора проб ЛРС [8]. Помимо ОФС в ГФ XI включено 83 частных статьи (ФС) на 86 видов ЛРС определенных морфологических групп [9], из которых одна статья посвящена стандартизации трех морфологических групп ландыша (цветков, травы и листьев) и одна — двух морфологических групп полыни горькой (травы и листьев) [9].

В ГФ XIII критерии и методы оценки качества ЛРС содержатся в 32 ОФС, из которых тринадцать посвящены методам анализа ЛРС, из них девять переработаны и включены взамен статей ГФ XI и три впервые включены в ГФ XIII [10]. Восемь ОФС посвящены методам диагностики отдельных морфологических групп ЛРС, из них семь переработаны и введены взамен статей ГФ XI и одна впервые включена в ГФ XIII («Почки»), пять ОФС посвящены лекарственным формам из ЛРС, из которых четыре переработаны и введены взамен статей ГФ XI, одна ОФС впервые включена в ГФ XIII, две посвящены лекарственным средствам растительного происхождения («Эфирные масла», «Масла жирные растительные» [10]), четыре ОФС включают требования к ЛРС и фармацевтическим субстанциям растительного происхождения, отбору проб, хранению, упаковке, маркировке и транспортированию ЛРС

и ЛРП [10]. Анализ перечня ОФС, регламентирующих качество ЛРС и ЛРП ГФ XI и ГФ XIII, представлен в таблице.

ГФ XIII содержит 55 ФС на 55 видов ЛРС, из которых 37 были включены в ГФ XI. ГФ XIII содержит также ФС на виды ЛРС, не вошедшие в ГФ XI. Например, в ГФ XIII включены ФС на «кориандра посевного плоды» и «солодки корни», которые содержались в ГФ IX и ГФ X соответственно и не были включены в ГФ XI [9–12].

ГФ XIII содержит также ФС на новые виды ЛРС, используемые в производстве лекарственных средств, — «аронии черноплодной сухие плоды», «гинкго двуллопастного листья», «тополя почки», «донника трава» [10].

ОФС на методы анализа ЛРС в ГФ XIII представлены как пересмотренными и дополненными ОФС с учетом современных достижений в фармакопейном анализе, так и впервые разработанными [10]. Для отечественной фармакопеи впервые разработана и введена ОФС.1.5.1.0001.15 «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения» [10], регламентирующая общие требования к ЛРС и фармацевтическим субстанциям растительного происхождения. В статье приведена классификация ЛРС в зависимости от морфологических групп, измельченности, содержания основных биологически активных соединений, назначения ЛРС, приведены показатели качества и методы испытаний ЛРС, общие требования к его хранению и упаковке. В статье впервые введено понятие «фармацевтической субстанции растительного происхождения», представляющей собой «стандартизованное лекарственное растительное сырье, а также вещество/вещества растительного происхождения и/или их комбинации, продукты первичного и вторичного синтеза растений, в том числе полученные из культуры клеток, суммы биологически активных веществ растений, продукты, полученные путем экстракции, перегонки, ферментации или другим способом переработки лекарственного растительного сырья и применяемые для профилактики и лечения заболеваний» [10]. Изменение статуса ЛРС, обусловленное введением понятия «фармацевтическая субстанция растительного происхождения», которое предполагает, что ЛРС следует отнести к лекарственным средствам (ЛС), позволит обеспечить требования к качеству как ЛРП, так и других ЛС растительного происхождения.

Впервые в отечественную фармакопейную практику введены две ОФС на методы анализа ЛРС: ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [10] и ОФС.1.5.3.0011.15 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [10].

Актуальным и своевременным для фармацевтического анализа является включение (впервые) ОФС.15.3.0012.15 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента ле-

Таблица 1. Общие фармакопейные статьи, включенные в ГФ XI и в ГФ XIII, регламентирующие качество лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения и методы их анализа

Table 1. General monographs included into SPh XI and SPh XIII laying out requirements for the quality of herbal substances, herbal medicinal products, and methods of their analysis

Наименование групп ОФС	ГФ XI	ГФ XIII	
	Наименование статей	Наименование статей, номер	Статус
ОФС на лекарственные формы	Экстракты	Экстракты ОФС.1.4.1.0021.15	Взамен ГФ XI, вып. 2
	Настойки	Настойки ОФС.1.4.1.0019.15	Взамен ГФ XI, вып. 2
	Настои и отвары	Настои и отвары ОФС.1.4.1.0018.15	Взамен ГФ XI, вып. 2
	Сборы	Сборы ОФС.1.4.1.0020.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	—*	Гранулы резано-прессованные ОФС.1.4.1.0022.15	Вводится впервые
ОФС на методы анализа и диагностики отдельных морфологических групп ЛРС	Травы	Травы ОФС.1.5.1.0002.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	Листья	Листья ОФС.1.5.1.0003.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	Цветки	Цветки ОФС.1.5.1.0004.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	Кора	Кора ОФС.1.5.1.0005.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	Корни, корневища, луковичи, клубни, клубнелуковичи	Корни, корневища, луковичи, клубни, клубнелуковичи ОФС.1.5.1.0006.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	Плоды	Плоды ОФС.1.5.1.0007.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	Семена	Семена ОФС.1.5.1.0008.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	—	Почки ОФС.1.5.1.0009.15	Вводится впервые
ОФС на лекарственные средства растительного происхождения	Масла эфирные	Эфирные масла ОФС.1.5.2.0001.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	—	Масла жирные растительные ОФС.1.5.2.0002.15	Взамен ГФ X, ст. 472
ОФС на методы анализа ЛРС, фармацевтических субстанций растительного происхождения и ЛРП	Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья амбарными вредителями	Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов ОФС.1.5.3.0002.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	—	Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах ОФС.1.5.3.0001.15	Взамен ОФС 42-0011-03
	Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье	Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах ОФС.1.5.3.0004.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	Определение золы. Определение золы, не растворимой в хлористоводородной кислоте	Зола общая ОФС.1.2.2.2.0013.15	Взамен ОФС 42-0055-07
	—	Зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте ОФС.1.5.3.0005.15	Взамен ГФ XI, вып. 2
	Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье	Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах ОФС.1.5.3.0006.15	Взамен ГФ XI, вып. 1

Продолжение таблицы 1

Наименование групп ОФС	ГФ XI	ГФ XIII	
	Наименование статей	Наименование статей, номер	Статус
ОФС на методы анализа ЛРС, фармацевтических субстанций растительного происхождения и ЛРП	Определение влажности лекарственного растительного сырья	Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов ОФС.1.5.3.0007.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье	Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах ОФС.1.5.3.0008.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье	Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах ОФС.1.5.3.0010.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	—	Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах ОФС.1.5.3.0011.15	Вводится впервые
	—	Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья ОФС.1.5.3.0012.15	Вводится впервые
	Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья	Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов ОФС.1.5.3.0003.15	Взамен ГФ XI, вып. 1
	—	Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах ОФС.1.5.3.0009.15	Вводится впервые
	Люминесцентная микроскопия	—	
Прочие ОФС	—	Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения. ОФС.1.5.1.0001.15	Вводится впервые
	Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб для анализа	Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов ОФС.1.1.0005.15	Взамен ГФ XI, ОФС 42-0013-03
	Хранение лекарственного растительного сырья	Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов ОФС.1.1.0011.15	Взамен ГФ XI
	Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья	Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов ОФС.1.1.0019.15	Взамен ГФ XI

Примечание: «—» означает отсутствие статьи.

каственного растительного сырья» [10]. Использование коэффициента водопоглощения при изготовлении водных извлечений из ЛРС позволит не только улучшить условия извлечения биологически активных веществ, но и уменьшить их потери.

Большинство ОФС на методы анализа ЛРС переработаны и дополнены с учетом современных достижений науки в области анализа ЛС. Так, взамен ОФС ГФ XI «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [8] в ГФ XIII введена одноименная статья (ОФС.1.5.3.0006.15 [10]), требования которой распространяются на ЛРС и ЛРП, предназначенные для получения экстракционных лекарственных форм (настои, отвары, экстракты). Наряду с гра-

виметрическим методом определения содержания экстрактивных веществ в ЛРС и ЛРП, которые в дальнейшем подвергаются однократной экстракции (метод 1), описанном в ГФ XI [8], дополнительно включено два метода: метод многократной экстракции одним растворителем с дальнейшим получением суммарного экстракта (метод 2) и метод последовательной экстракции различными экстрагентами с последующим определением содержания экстрактивных веществ в каждой фракции (метод 3) [10].

ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [10] дополнена условиями подготовки проб, оптимальным температурным режимом проведения испытания свежесобранного

ЛРС; дополнительно к гравиметрическому методу определения влажности предусмотрена возможность использования влагомеров термографических инфракрасных с необходимостью указания навески, измельченности ЛРС, режима сушки и последующей валидации методики.

Существенно переработана ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»: в нее включены понятия подлинности, измельченности и содержания примесей, приведена методика получения средней пробы (метод квартования), установлены требования и нормы к оценке подлинности, измельченности и содержанию примесей [10]. Раздел «Подлинность» в этой статье, помимо анализа по внешним и анатомо-диагностическим признакам при микроскопическом исследовании, проведения качественных реакций, предусматривает определение подлинности хроматографическими, спектральными или другими методами в соответствии с требованиями ФС. В разделе «Определение измельченности» [10] по сравнению с ГФ XI [8] для цельного ЛРС включены общие требования к содержанию измельченных частиц («частиц меньшего размера»), проходящих сквозь сито; для измельченного ЛРС и порошка регламентируется содержание как измельченных частиц, так и частиц «большого размера», не проходящих сквозь сито. В зависимости от структуры, морфологических особенностей и размеров ЛРС для цельного сырья предусмотрено использование сит с размером отверстий 3; 2; 1; 0,5 мм [10]. Для всех видов ЛРС (цельного, измельченного и порошка) установлены нормы для содержания крупных и мелких частиц — не более 5 %, в то время как в ГФ XI нормы были указаны в ФС на конкретный вид ЛРС, и в подавляющем большинстве случаев они составляли более 10 %. Для измельченного ЛРС предусмотрен размер частиц не более 7, или не более 5, или не более 3 мм [10], для порошка нормируется содержание частиц «большого» размера — не более 2 мм [10]. Просеивание измельченного ЛРС осуществляют с помощью нижнего сита с размером отверстий 0,5 мм, а в ряде случаев, когда ЛРС достаточно ломкое, например, «ромашки цветки», «мяты перечной листья», «донника трава», размер отверстий нижнего сита составляет 0,18 мм. Для просеивания порошка применяют нижнее сито, также имеющее размер отверстий 0,18 мм [10].

Известно, что существует наиболее рациональная степень измельчения, ниже которой измельчать материал нежелательно [13]. Содержание большого количества измельченных частиц сопровождается увеличением числа клеток, имеющих разрушенную оболочку. Кроме этого, увеличенное содержание мелких частиц, особенно содержащих крахмал, слизи, пектиновые вещества, способствует их слеживанию и образованию комков, оседающих на дно. Все это затрудняет проникновение экстрагента в клетку, замедляет процесс извлечения биологически активных веществ из ЛРС и способствует получению мутного и плохо фильтрующегося извлечения [14].

Количество частиц определенного размера должно соответствовать установленным нормам, так как в различных морфологических группах ЛРС (например, листья, плоды, подземные органы) содержится различное количество биологически активных веществ. При одновременном содержании как крупных, так и мелких частиц нарушается их распределение в слое ЛРП, приводящее к неоднородности его дозирования и неравномерному экстрагированию биологически активных веществ.

Раздел «Определение содержания примесей» [10] регламентирует две группы примесей: допустимые и недопустимые. Приведена методика определения органической примеси, частей ЛРС, утративших окраску, и других частей этого растения. Дополнительно приведена методика определения минеральной примеси. Для каждого типа допустимых примесей устанавливаются пределы содержания: органической должно быть «не более 1 %», минеральной — «не более 1 %», частей сырья, утративших окраску, присущую данному виду сырья, — «не более 3 %», других частей растения, не соответствующих установленному описанию, — «не более 2 %». Нормируются недопустимые примеси — это стекло, помет грызунов и птиц, части ядовитых растений, части растений, утративших окраску, с указанием их недопустимой окраски [10].

В ОФС.1.5.3.0008.15 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [10] дополнительно к методу, основанному на окислительных реакциях дубильных веществ (перманганатометрическое титрование), включенному в ГФ XI [8] и в нормативную документацию отечественных производителей на ЛРС и ЛРП, содержащие дубильные вещества, введен спектрофотометрический метод, включенный в Европейскую фармакопею [15]. Он предусматривает определение содержания сначала общих полифенольных соединений, затем полифенольных соединений, не адсорбируемых так называемым кожным (гольевым) порошком. По разности устанавливается содержание дубильных веществ, адсорбируемых кожным порошком, и пересчитывается их содержание на пирогаллол.

В число ОФС на лекарственные формы включены не только актуализированные статьи — ОФС.1.4.1.0019.15 «Настойки» [10], ОФС.1.4.1.008.15 «Настои и отвары» [10], ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» [10], ОФС.1.4.1.0020.15 «Сборы» [10], но и вновь разработанные. Некоторые из вновь разработанных ОФС впервые введены в практику не только отечественного, но и мирового фармакопейного анализа, например ОФС.1.4.1.0022.15 «Гранулы резано-прессованные» [10]. Данная лекарственная форма представляет собой «кусочки цилиндрической, округлой или неправильной формы, полученные из ЛРС и предназначенные для получения водных извлечений». Для производства гранул резано-прессованных могут использоваться только такие виды ЛРС, в которых в процессе гранулирования не снижается содержание биологически активных веществ [10].

ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» [10], помимо особенностей технологии, регламентирует показатели и содержит критерии оценки качества данной лекарственной формы («Описание», «рН водного извлечения», «Определение сухого остатка»), контроль качества которой осуществляется при изготовлении водного извлечения в аптечном учреждении, а также при технологическом процессе производства ЛРП.

ОФС.1.1.1.0019.15 «Настойки» [10], кроме испытаний на сухой остаток и тяжелые металлы, определения содержания спирта или плотности, действующих веществ, предусматривает проведение испытаний по показателю, который регламентируется ведущими зарубежными фармакопеями — «Метанол и 2-пропанол» [15, 16].

В ОФС.1.4.1.0020.15 «Сборы» [10] дополнительно включены: качественные реакции, хроматографический и УФ-спектрофотометрический анализ, испытания на однородность массы, зараженность вредителями запасов, нормирование радионуклидов, тяжелых металлов, остаточных количеств пестицидов — показателей, обеспечивающих безопасность ЛП, получаемых из ЛРС.

ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» [6] предусматривает контроль качества по показателю «Насыпной объем» в соответствии с требованиями впервые включенной в ГФ XIII ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» [10]. Для масляных экстрактов проводят определение плотности, кислотного числа, йодного, перекисного и числа омыления, растворимости и показателя преломления. Предусмотрено определение массы или объема содержимого упаковки и при необходимости — остаточного количества органических растворителей [10].

ГФ XIII содержит семь ОФС на морфологические группы ЛРС: «Листья», «Травы», «Цветки», «Плоды», «Семена», «Кора», «Корни, корневища, луковицы, клубнелуковицы» [10], которые, по сравнению с ГФ XI [8], существенно переработаны и дополнены. Показатель «Внешние признаки» изложен с учетом способов исследования ЛРС: «невооруженным глазом» и «с помощью лупы (10×) или стереомикроскопа (8×, 16×, 24×)». Совокупность признаков по данному показателю переработана и дополнена для всех групп ЛРС. Например, для листьев предусмотрено исследование черешков, поскольку листья могут как содержать, так и не содержать черешок; для трав — стеблей; для подземных органов — проводящих элементов. В ОФС введено описание внешних признаков порошка.

В показателе «Микроскопические признаки» расширена совокупность признаков для всех морфологических групп ЛРС и всех способов переработки (цельного, измельченного и порошка). При изучении листьев дополнительно предусмотрен микроскопический анализ черешка, для травы — стебля. Для характеристики некоторых анатомо-диагностических признаков (устыща, волоски, железки, кристаллы, друзы и др.) предусмотрено определение их размеров с целью более точной диагностики. Описание микроскопических признаков сопровождается

иллюстративным материалом (микрофотографией или рисунком) анатомических диагностических признаков с указанием увеличения, позволяющего обеспечить точность идентификации ЛРС.

Впервые в ОФС на морфологические группы ЛРС включены такие показатели качества, как «Масса содержимого упаковки», «Зараженность вредителями запасов», «Радионуклиды», «Тяжелые металлы», «Остаточные количества пестицидов», «Микробиологическая чистота», «Количественное определение», «Упаковка», «Маркировка», «Транспортирование», «Хранение», «Срок годности». Для оценки подлинности предусмотрено использование современных методов физико-химического анализа (хроматографических, спектрофотометрических) [10].

Впервые в практику отечественного фармакопейного анализа включена ОФС.1.5.1.0009.15 «Почки», регламентирующая требования к ЛРС, которое представляет собой «цельные, собранные в соответствующий период вегетации и высушенные боковые (пазушные) и верхушечные (терминальные) почки» [10].

ФС на ЛРС в ГФ XIII унифицированы и имеют одинаковую структуру, гармонизированную (по сравнению с ГФ XI [8, 9]) с требованиями европейских фармакопейных стандартов на ЛРС.

Вместо раздела «Числовые показатели» [9] предусмотрен раздел «Испытания», в котором приведены такие показатели, как «Определение экстрактивных веществ», «Зола общая», «Зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте», «Влажность», «Измельченность», «Посторонние примеси» (органическая примесь и минеральная примесь). Впервые включены показатели «Тяжелые металлы и мышьяк», «Остаточные количества пестицидов» [10].

Внесены изменения в названия ФС. Наименование ЛРС в ГФ XI складывалось из наименования морфологической группы ЛРС [9] во множественном числе и родового или видового наименования производящего растения в родительном падеже, исключение составляли «кора» и «трава», которые употреблялись в единственном числе в именительном падеже [9].

В ГФ XIII в заголовках ОФС на ЛРС наименование ЛРС формируется из родового наименования производящего растения в родительном падеже [10] и наименования морфологической группы сырья во множественном числе в именительном падеже [10], исключение составляют «кора» и «трава», употребляющиеся в единственном числе. Например, «алтея корни», «пустырника трава» (ГФ XIII) [10] вместо «корни алтея», «трава пустырника» (ГФ XI) [9]. В ряде случаев, когда используется только один ботанический вид производящего растения, приведено видовое наименование производящего растения на русском языке в сочетании с наименованием морфологической группы, например, «сосны обыкновенной почки», «ромашки аптечной цветки», «череды трехраздельной трава» вместо «почки сосны», «цветки ромашки», «трава череды».

Переработаны и дополнены в соответствии с требованиями ОФС на морфологическую группу

ЛРС показатели качества «Внешние признаки» [5, 6] и «Микроскопические признаки» [9, 10].

В показателе «Внешние признаки» для некоторых видов ЛРС в качестве недопустимых примесей указаны другие виды этого же рода или растения другого рода, сходные по морфологическим признакам. Например, для «череды трехраздельной травы» в качестве недопустимых примесей указаны череда лучистая и череда поникшая; для «крапивы двудомной листьев» — крапива жгучая, крапива коноплевая и яснотка белая [10].

Для идентификации ЛРС по ГФ XI [9] всегда использовался макро- (внешние признаки) и микроскопический (анатомические диагностические) анализ. В отдельных статьях для определения наличия биологически активных соединений были предусмотрены качественные реакции. Так, для «крушины коры» [9] наличие антраценопроизводных подтверждалось с помощью качественной реакции с раствором натрия гидроксида (вишнево-красное окрашивание) и с помощью реакции микросублимации. В некоторых ФС оценка подлинности с помощью качественных реакций отсутствовала, например, для пижмы цветков, фиалки травы, чабреца травы, лапчатки корневищ [9]. Для некоторых видов ЛРС в ГФ XI с целью идентификации отдельных групп биологически активных веществ использовались хроматографические методы анализа. Например, содержание гиперозида в боярышника плодах определяли методом ТСХ; содержание флавоноидов для череды травы методом бумажной хроматографии [9].

В ГФ XIII для всех видов ЛРС предусмотрен раздел «Определение основных групп биологически активных веществ» [10], в который, практически для всех фармацевтических субстанций растительного происхождения (кроме «алтея корни» [10], «льна посевного семена» [10], «подорожника большого листа» [10]), включен метод ТСХ, а в ряде случаев дополнительно предусмотрено подтверждение подлинности биологически активных веществ с помощью качественных реакций. Хроматографические методики, которые были включены в ГФ XI для крапивы листьев, череды травы, хвоща полевого травы, женьшеня корней, родиолы розовой корневищ и корней [9], заменены на более специфичные и позволяющие идентифицировать другие группы биологически активных веществ. В частности, для крапивы листьев помимо ТСХ-методики определения витамина K₁ предусмотрена ТСХ-методика, позволяющая идентифицировать также фенилпропаноиды, а именно хлорогеновую кислоту [10].

В ГФ XI [9] для стандартизации ЛРС зачастую использовались неспецифические методы количественной оценки биологически активных соединений (например, только определение содержания экстрактивных веществ) или оценивалось содержание веществ, которые не отвечают за фармакологическое действие сырья. Например, в статье «Листья вахты трехлистной» определялось содержание флавонолов в пересчете на рутин, хотя ведущей группой биологически активных соединений, обуславливающей

фармакологическую активность сырья, являются иридоиды (горечи).

В ГФ XIII [10] впервые практически во все ФС включены методики количественного определения основных групп биологически активных веществ. Например, для бузины черной цветков, крапивы двудомной листьев, хвоща полевого травы в ГФ XI не было предусмотрено определения биологически активных соединений, в отличие от ГФ XIII, в которой регламентируется содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, суммы полисахаридов, суммы оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин соответственно [9, 10].

В некоторых ФС введена оценка содержания нескольких групп биологически активных веществ [10]. Например, для череды трехраздельной травы предусмотрено определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин и суммы полисахаридов (сырье, предназначенное для производства ЛРП, — пачки, фильтр-пакеты); для шалфея лекарственного листьев — определение эфирных масел (сырье, предназначенное для получения эфирного масла), дубильных веществ (сырье, предназначенное для производства ЛРП, — пачки, фильтр-пакеты) и экстрактивных веществ (сырье, предназначенное для производства экстрактов) [10].

Для некоторых видов ЛРС внесены изменения в методику определения содержания биологически активных соединений. Так, для подорожника большого листьев [10] в методике количественного определения полисахаридов объединенные водные извлечения отфильтровывают после экстракции вместо центрифугирования, как было по ГФ XI [10], увеличено также время нагревания на водяной бане с 5 до 30 минут. Вводимые изменения позволяют не только упростить методику испытания, но и удешевить ее, сократив при этом используемое оборудование и вспомогательные материалы.

Важным этапом при разработке современных показателей качества, включенных в ГФ XIII, позволяющих проводить стандартизацию ЛРС и препаратов на его основе, явилась гармонизация требований к качеству с ведущими зарубежными фармакопеями. Так, например, в ГФ XIII включена ОФС.1.5.2.0002.15 «Масла жирные растительные», гармонизированная с Европейской фармакопеей [15]. Контроль качества масел жирных растительных с 1968 по 2015 г. регламентировался требованиями общей статьи 472 ГФ X «Масла жирные» [12]. В ОФС «Масла жирные растительные» [10] уточнено определение масел жирных растительных, приведена их классификация в зависимости от состава и химической структуры высших жирных кислот, описаны особенности технологии получения. В ОФС дополнительно включены некоторые физические и химические константы, позволяющие определять подлинность и доброкачественность масел жирных растительных. Так, например, введен показатель «Температура плавления и/или температура затвердевания» [10], специфичный для каждого вида масла жирного растительного, так как он зависит от структуры триглицеридов, входящих

в состав масла, и служит характеристикой степени чистоты жиров и жирных кислот. С целью оценки накопления суммы продуктов перекисного окисления жирнокислотных остатков липидов введен «Индекс окисленности» [10]. Для характеристики доброкачественности масла жирного растительного (отсутствие примесей минерального масла, парафина и т.п.) служит показатель «Неомыляемые вещества» [10]. Сорбирование летучих веществ, в том числе эфирных масел растений, характеризует показатель «Летучие вещества» [10]. Для определения наличия или отсутствия в маслах жирных растительных примеси органических растворителей, применяемых для извлечения масла из маслянистого сырья путем экстракции, используется показатель «Остаточные органические растворители» [10].

Аналогично ведущим зарубежным фармакопеям в ГФ XIII предусмотрен контроль содержания радионуклидов в ЛРС и ЛРП (ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [10]).

ГФ XIII содержит также статьи, не имеющие аналогов в зарубежных фармакопеях. Так, например, ОФС.1.5.3.0002.15 «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов» [10], введенная взамен ОФС ГФ XI «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья амбарными вредителями» [8]. Статья содержит изменения редакционного и уточняющего характера. Например, предусмотрено указание, что анализ должен проводиться не позднее 2 сут с момента поступления сырья, чтобы насекомые не успели впасть в спячку, а в холодное время года рекомендуется перед анализом выдерживать пробу не менее 1,5–2 ч при комнатной температуре.

Таким образом, результаты проведенного анализа требований ГФ XI и ГФ XIII к стандартизации ЛРС и ЛРП свидетельствуют, что количество ОФС, посвященных оценке качества ЛРС, возросло. Стандарты качества гармонизированы с ведущими зарубежными фармакопеями.

В ГФ XIII нашло отражение решение одной из актуальных проблем современной фармацевтической науки и практики — расширение отечественной номенклатуры ЛРС, прежде всего за счет включения в число официальных в РФ неофициальных видов, имеющих многовековую историю применения в традиционной медицине. Однако богатейший ассортимент ЛРС, веками применявшийся в отечественной народной медицине и входивший в ранние издания Российской фармакопеи, в современной официальной медицинской практике используется не в полной мере.

Впервые в практику отечественного фармакопейного анализа введена ОФС, определяющая требования к ЛРС как фармацевтической субстанции растительного происхождения, что предполагает отнесение ЛРС к лекарственным средствам.

Впервые в РФ разработана ОФС, предусматривающая испытания на допустимые пределы содер-

жания тяжелых металлов и мышьяка в ЛРС, позволяющая определять и нормировать предельные количества отдельных элементных примесей, что является передовым в области оценки качества не только ЛРС, но и других ЛС.

В ГФ XIII предусмотрено введение специфичных методов анализа для идентификации и количественного определения биологически активных веществ (БАВ), обуславливающих специфическое фармакологическое действие ЛРС. Показано, что наиболее востребованными до сих пор являются методики спектрофотометрического определения, позволяющие проводить одновременную количественную оценку суммы нескольких групп БАВ в пересчете на вещества-стандарты. Однако опыт зарубежных фармакопей — Европейской [15], Фармакопеи США [16] показывает, что актуальным является введение специфичных методов идентификации и количественного определения БАВ: методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии.

В ГФ XIII получила развитие современная тенденция определения не одной, а двух и более групп БАВ, ответственных за фармакологическое действие ЛС.

В ГФ XIII пересмотрены методики количественного определения БАВ, обоснованы новые числовые показатели, в частности, значения нижнего предела содержания действующих веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важное значение в настоящее время приобрели вопросы сквозной стандартизации ЛС: Лекарственное растительное сырье / Растительные фармацевтические субстанции / Лекарственные препараты и, в связи с этим, вопросы разработки современных методов анализа, позволяющих в полной мере оценить не только все разнообразие химического состава ЛРС, но и выявить доминирующие и диагностически значимые группы БАВ, что актуально для контроля качества близкородственных видов ЛРС.

Анализ требований в области оценки качества ЛРС в ГФ XIII и ГФ XI актуален при пересмотре и разработке ОФС и ФС, формирующих Государственную фармакопею Российской Федерации последующих изданий.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the FSBI "SCEEMP" of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 23 октября 2009 г. № 965 «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 г.». [Order of the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation, October 23, 2009 No. 965 «On adoption of the Strategy of the Russian pharmaceutical industry development until 2020» (In Russ.)]
2. Цындымеев АГ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Саканян ЕИ. Российская фармакопейная практика и перспективы ее развития. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(2):4–7. [Tsyndymeev AG, Olefir YuV, Merkulov VA, Sakanyan EI. Russian pharmacopoeial practices and the prospects for future development. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(2):4–7 (In Russ.)]
3. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Шемерянкина ТБ, Мочкикина ОА, Бунятян НД. Общие фармакопейные статьи и фармакопейные статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2015;(2):54–8. [Merkulov VA, Sakanyan EI, Shemeryankina TB, Mochikina OA, Bunyatyan ND. General monographs and monographs of the State pharmacopoeia of Russian Federation, XIII edition. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2015;(2):54–8 (In Russ.)]
4. Филиппова И. Фармакопея — гармонизация без потерь. *Ремедиум*. 2008;(12):8–9. [Filippova I. Pharmacopoeia — harmonization without risk of loss. *Remedium*. 2008;(12):8–9 (In Russ.)]
5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 771 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей». [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation, October 29, 2015 No. 771 «On adoption of general monographs and monographs» (In Russ.)]
6. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». [Federal law of the Russian Federation, April 12, 2010, No. 61-FZ «On circulation of medicines» (In Russ.)]
7. Сакаева ИВ, Бунятян НД, Саканян ЕИ, Шишова ЛИ, Корсун ЛВ, Мочкикина ОА и др. Лекарственные средства растительного происхождения в современных лекарственных формах: характеристика и классификация. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(4):51–8. [Sakaeva IV, Bunyatyan ND, Sakanyan EI, Shishova LI, Korsun LV, Mochikina OA, et al. Herbal medicines in modern dosage forms: characteristics and classification. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013; (4): 51–8 (In Russ.)]
8. Государственная фармакопея СССР: Общие методы анализа. 11-е изд. Вып. 1. М.: Медицина; 1987. [The State pharmacopoeia of the USSR. General Test Methods. 11th ed. Vol. 1. Moscow: Meditsina; 1987 (In Russ.)]
9. Государственная фармакопея СССР: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 11-е изд. Вып. 2. М.: Медицина; 1990. [The State pharmacopoeia of the USSR. General Test Methods. Medicinal Herbal Raw Materials. 11th ed. Vol. 2. Moscow: Meditsina; 1990 (In Russ.)]
10. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. Т.1–3. М.; 2015. [The State pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed., Moscow; 2015 (In Russ.)]
11. Государственная фармакопея СССР. 9-е изд. М.: Медгиз; 1961. [The State pharmacopoeia of the USSR. 9th ed. Moscow: Medgiz; 1961 (In Russ.)]
12. Государственная фармакопея СССР. 10-е изд. М.: Медицина; 1968. [The State pharmacopoeia of the USSR. 10th ed. Moscow: Meditsina; 1968 (In Russ.)]
13. Сорокина АА. Теоретическое и экспериментальное обоснование стандартизации настоев, отваров и сухих экстрактов из лекарственного растительного сырья: автореферат дис. ... д-ра фармацевтических наук. М.; 2002. [Sorokina AA. Theoretical and Experimental Substantiation of Standardization of Tinctures, Decoctions and Dry Extracts of Herbal Substances. Dr. Pharm. Sci. [thesis]. Moscow; 2002 (In Russ.)]
14. Краснюк ИИ. *Фармацевтическая технология. Технология лекарственных форм*. М.: Академия; 2005. [Krasnyuk II. *Pharmaceutical Technology. Dosage Forms Technology*. Moscow: Academia; 2005 (In Russ.)]
15. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017. Available from: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
16. United States Pharmacopoeia, USP 40-NF 35; 2017. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf/display?cmd=jsp&page=chooser>

ОБ АВТОРАХ

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук, проф., директор Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8536-4804>

Ковалева Елена Леонардовна, д-р фарм. наук, заместитель директора Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4163-6219>

Фролова Лариса Николаевна, канд. фарм. наук, ведущий эксперт Управления по качеству лекарственных средств № 4 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7170-7220>

Шелестова Валентина Васильевна, канд. фарм. наук, ведущий эксперт Управления по качеству лекарственных средств № 4 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

AUTHORS

Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.), Professor, Director of the Centre of Pharmacopoeia and International Collaboration of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8536-4804>

Elena L. Kovaleva, Dr. Sci. (Pharm.), Deputy Head of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4163-6219>

Larisa N. Frolova, Cand. Sci. (Pharm.), Leading Expert of Division No. 4 on Medicinal Products' Quality of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7170-7220>

Valentina V. Shelestova, Cand. Sci. (Pharm.), Leading Expert of Division No. 4 on Medicinal Products' Quality of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia

Статья поступила 28.12.2017
Принята к печати 22.08.2018

Article received 28 December 2017
Accepted for publication 22 August 2018

Сравнительная оценка эффективности фармакотерапии депрессивного расстройства методом количественной фармако-ЭЭГ

О. М. Куделина*, Ю. С. Макляков, Д. П. Хлопонин, В. Г. Заика, Е. В. Ганцгорн,
А. В. Сафроненко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Ростовский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Нахичеванский переулок, д. 29, Ростов-на-Дону, 344022, Российская Федерация

Своевременная диагностика и эффективная фармакотерапия депрессивных расстройств является актуальной проблемой в медицинской практике. Метод количественной фармако-электроэнцефалографии позволяет дифференцированно оценить эффективность лечения данного аффективного расстройства. **Цель работы:** проведение сравнительного анализа фармакологической активности двух схем лечения соматизированного депрессивного расстройства средней степени тяжести у пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта: монотерапии антидепрессантом из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина — флуоксетином и его комбинированного применения с лекарственным препаратом, содержащим мелатонин. **Методы:** с помощью шкалы Гамильтона (HDRS-17) проводилась оценка степени тяжести депрессивного расстройства у пациентов и эффективности применения обозначенных схем фармакотерапии. Методом количественной фармако-электроэнцефалографии (фармако-ЭЭГ), использовавшимся как до начала лечения, так и на фоне проведения соответствующего режима фармакотерапии, осуществлялся анализ влияния вышеуказанных лекарственных средств на функциональное состояние головного мозга пациентов с депрессивным расстройством. **Результаты:** показано, что комбинация флуоксетина с мелатонином способствует более быстрому регрессу депрессивной симптоматики согласно шкале HDRS-17. Метод количественной фармако-ЭЭГ позволил выявить характерные различия во влиянии флуоксетина при монотерапии или комбинированном применении с мелатонином на биоэлектрическую активность головного мозга пациентов. **Выводы:** проведенный анализ относительного значения мощности ритмов головного мозга пациентов методом количественной фармако-ЭЭГ показал, что восстановление нормальных значений ритмов ЭЭГ на фоне комбинации флуоксетина с мелатонином происходит быстрее, чем при монотерапии флуоксетином, прием которого не привел к полной ремиссии текущего депрессивного эпизода у ряда пациентов при лечении в течение 42 сут.

Ключевые слова: депрессивное расстройство; количественная фармако-электроэнцефалография (фармако-ЭЭГ); шкала Гамильтона (HDRS-17); флуоксетин; мелатонин

Для цитирования: Куделина ОМ, Макляков ЮС, Хлопонин ДП, Заика ВГ, Ганцгорн ЕВ, Сафроненко АВ. Сравнительная оценка эффективности фармакотерапии депрессивного расстройства методом количественной фармако-ЭЭГ. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):179–186. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-179-186>

***Контактное лицо:** Куделина Оксана Михайловна; kuomi81@mail.ru

Evaluation of the Efficacy of Depressive Disorders Pharmacotherapy Using Quantitative Pharmaco-EEG

O. M. Kudelina*, Yu. S. Maklyakov, D. P. Khloponin, V. G. Zaika, E. V. Gantsgorn,
A. V. Safronenko

Rostov State Medical University,
29 Nakhichevansky Lane, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation

Timely diagnosis and efficacious pharmacotherapy of depressive disorders are of immediate concern to the medical practice. The quantitative pharmaco-electroencephalography method enables differential evaluation of the affective disorder treatment efficacy. **The aim of the study** was to perform comparative evaluation of pharmacological activity of two treatment regimens for moderate somatization disorders in patients with gastrointestinal pathology: monotherapy with fluoxetine — an antidepressant of the selective serotonin reuptake inhibitors class, and combination therapy with melatonin-containing medicine. **Methods:** the severity of the depressive disorder and the efficacy of the treatment regimens were assessed using the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS-17). The quantitative pharmaco-electroencephalography (pharmaco-EEG) was used both before and during the treatment to analyse the effect of the medicinal products on the functional state of the brain in the patients with depressive disorder. **Results:** it was shown that the combination of fluoxetine and melatonin results in a more rapid regression of depressive symptoms according to the HDRS-17 scale. The quantitative pharmaco-EEG method helped to reveal specific differences between the effect of fluoxetine as monotherapy and in combination with melatonin on the bioelectrical activity on the patients brain. **Conclusions:** the analysis of the relative power of the patient brain rhythms by pharmaco-EEG demonstrated a more rapid restoration of normal EEG rhythms in the patients who received the combination of fluoxetine and melatonin, than in those patients who received fluoxetine monotherapy which did not result in complete remission of the existing depressive episode in a number of patients after the 42-day treatment course.

Key words: depressive disorder; quantitative pharmaco-electroencephalography (pharmaco-EEG); Hamilton Depression Rating Scale (HDRS-17); fluoxetine; melatonin

For citation: Kudelina OM, Maklyakov YuS, Khloponin DP, Zaika VG, Gantsgorn EV, Safronenko AV. Evaluation of the efficacy of depressive disorders pharmacotherapy using quantitative pharmaco-EEG. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2018;8(3):179–186. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-179-186>

*Corresponding author: Oksana M. Kudelina; kuomi81@mail.ru

В настоящее время распространенность депрессивного расстройства (ДР) достаточно высока как в развивающихся, так и в экономически развитых странах. Данная аффективная патология представляет собой весьма серьезное психоэмоциональное расстройство, от которого страдает до 21 % населения в мире [1]. По данным клинических исследований число депрессий среди пациентов соматического профиля составляет 22–33 % и превосходит такое распространенное заболевание, как артериальная гипертензия [2]. Среди хронических соматических заболеваний с рецидивирующим течением ведущее положение занимают заболевания желудочно-кишечного тракта. Эти заболевания могут сопровождаться аффективными расстройствами, способными влиять на формирование и поддержание соматической патологии [3, 4].

Проблема фармакотерапии ДР, несмотря на широкий спектр применяемых антидепрессантов, остается весьма актуальной [5]. Применение лекарственных средств (ЛС) из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС), в отличие от трициклических антидепрессантов, с практической точки зрения имеет некоторые преимущества: безопасность применения, лучшую переносимость пациентами и возможность направленного действия на причину психического расстройства. На сегодняшний день одним из наиболее значимых представителей СИОЗС является флуоксетин [6].

С целью повышения эффективности фармакотерапии СИОЗС комбинируют с представителями других групп ЛС. В литературе представлены данные о применении антидепрессантов в сочетании с антипсихотиками [7]. Для комбинированной фармакотерапии ДР заслуживает внимания гормон эпифиза мелатонин (МТ), который участвует в процессах неспецифической антистрессорной защиты организма и регулирует циркадные ритмы [8].

Анализ электрической активности головного мозга (ГМ) представляет собой высокоспецифичный инструмент для изучения нейробиологии нарушений психической деятельности при различных патологиях центральной нервной системы [9, 10]. Одним из наиболее информативных методов оценки эффективности действия психотропных средств является количественная фармако-электроэнцефалография (фармако-ЭЭГ). Использование этого неинвазивного метода представляется целесообразным для анализа активности психотропных ЛС и мониторинга эффективности фармакотерапии [11–13].

Цель работы — сравнительный анализ эффективности лечения соматизированного ДР средней степени тяжести современными антидепрессантами, проводимый методом количественной фармако-ЭЭГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 47 человек. Проведение данного исследования было одобрено Локальным независимым этическим комитетом при Ростовском государственном медицинском университете (выписка из протокола № 34 ЛНЭК при РостГМУ от 7 июня 2011 г.).

В контрольную группу К включили потенциально здоровых людей ($n = 17$). Группу Д ($n = 30$) составили пациенты с диагнозом ДР. Выявление ДР производилось при клиническом обследовании в соответствии с критериями классификатора МКБ-10, а тяжесть состояния оценивалась с помощью 17-пунктовой шкалы Гамильтона (HDRS-17).

Далее пациентов группы Д разделили на 2 клинические группы в зависимости от схемы назначенной фармакотерапии: в группе Ф ($n = 15$) пациенты получали флуоксетин (20 мг/сут, однократно), а в группе Ф+М ($n = 15$) флуоксетин (20 мг/сут, однократно) и мелатонин (3 мг/сут, однократно за час до сна).

До начала лечения средний балл по шкале HDRS-17 у пациентов в обеих группах соответствовал ДР средней степени тяжести: в группе Ф — $19,6 \pm 2,5$ балла, в группе Ф+М — $19,3 \pm 2,1$ балла.

Пациенты, которые получали какие-либо психотропные лекарственные препараты до начала исследования, в течение семи суток находились в «лекарственном покое» с целью исключения взаимодействия препаратов. Психотерапия не проводилась.

Критериями эффективности проводимой терапии являлись данные HDRS-17 до начала лечения, затем на 14-е, 28-е и 42-е сут приема лекарственного препарата (ЛП), а также результаты количественной фармако-ЭЭГ до приема назначенных ЛП и спустя 42 сут. Электроэнцефалограммы (ЭЭГ) пациентов регистрировали на 8-канальном энцефалографе-анализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» (Россия). Анализировали параметр относительного значения мощности (ОЗМ, %) для δ (дельта) — (1–4 Гц), θ (тета) — (5–7 Гц), α (альфа) — (8–12 Гц) и β (бета) — (13–30 Гц) частотных диапазонов ЭЭГ. Достоверность различия ОЗМ ЭЭГ-ритмов пациентов в группах К, Д, Ф и Ф+М оценивалась с помощью t -критерия Стьюдента при уровнях значимости $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пациенты, получавшие флуоксетин в сочетании с мелатонином (группа Ф+М), на 14-е сут лечения отмечали общее улучшение самочувствия, но при этом у них сохранялись жалобы на пониженное настроение. При опросе пациенты жаловались на трудности при засыпании и раннее пробуждение, но частых пробуждений в ночное время они не отме-

чали. Сохранялись жалобы на усталость, слабость, снижение полового влечения, сниженный аппетит или его отсутствие, ощущение тяжести в области желудка, снижение массы тела.

На 28-е сут наблюдения более чем у половины пациентов данной группы количество жалоб существенно снизилось, и они достигли порогового уровня ниже 7 баллов по шкале HDRS-17, что расценивалось как наступление ремиссии депрессивного эпизода.

В группе Ф пациенты, принимавшие один флуоксетин, отмечали частичное улучшение состояния только на 28-е сут наблюдения, а средний балл по HDRS-17 уменьшился в 1,7 раза ($p < 0,01$). Некоторые пациенты продолжали отмечать чувство необоснованной усталости, слабости, пониженного настроения, снижение полового влечения. Сохранялась проблема с засыпанием, и присутствовало беспокойство в связи с ранним пробуждением, но бессонница тревожила уже меньше, а также уменьшилась чрезмерная озабоченность своим здоровьем.

Позитивная динамика в терапии ДР сохранялась у пациентов обследуемых групп и в дальнейшем. На 42-е сут средний балл в группе Ф был в 2,5 раза ($p < 0,01$), а в группе Ф+М — в 3,6 раза ($p < 0,01$) ниже, чем исходный средний балл до начала лечения (табл. 1).

По окончании периода наблюдения порога ниже 7 баллов по HDRS-17 достигли все пациенты в группе Ф+М, и в целом их самочувствие было хорошим, однако при опросе некоторых из них еще беспокоили проблемы сниженного полового влечения.

У 60 % пациентов в группе Ф балльная оценка по HDRS-17 соответствовала легкой степени тяжести ДР (7–16 баллов), а у остальных, соответственно, она была ниже 7 баллов. В то же время у большинства обследуемых в этой группе все еще сохранялась разнообразная симптоматика ДР, которая проявлялась периодическими ощущениями снижения работоспособности, усталости, у ряда лиц сохранялись проблемы раннего пробуждения с последующей неспособностью заснуть повторно, присутствовали признаки соматической тревоги за свое здоровье и т.д.

Таким образом, по итогам курса лечения ДР длительностью 42 сут следует отметить, что пациенты в клинической группе Ф+М достигли стойкого улучшения текущего аффективного состояния, чего

Таблица 1. Динамика выраженности депрессии по шкале HDRS-17 у пациентов обследуемых групп

Визиты пациентов	Группы пациентов	
	Ф	Ф+М
	Баллы	
До лечения	19,6 ± 2,5	19,3 ± 2,06
14 сут	15,7 ± 1,6*	12,5 ± 2,3*
28 сут	11,6 ± 2,0**	8,4 ± 1,2**
42 сут	7,9 ± 1,5**	5,4 ± 0,9**

Примечание. Статистически достоверные различия результатов лечения с результатами до лечения при * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

не наблюдалось у пациентов в группе Ф, которые принимали один флуоксетин, они все еще нуждались в дальнейшем наблюдении и продолжении фармакотерапии.

Помимо оценки степени тяжести ДР с помощью HDRS-17 обследуемым пациентам производили регистрацию ЭЭГ. Оценка показателя ОЗМ ЭЭГ-ритмов различных отделов ГМ давала более полную информацию о влиянии фармакотерапии на биоэлектрическую активность ГМ в целом. Полученные данные сравнивались с результатами контрольных групп К и Д.

В норме у здорового человека (группа К) α -ритм доминирует в области затылка, и далее его показатели уменьшаются к фронтальным отделам. Максимальные значения β -ритма, наоборот, наблюдаются в области лба и центральном отведении ГМ [10]. Именно такое распределение ОЗМ регистрировалось в группе К (табл. 2).

У пациентов в группе Д до начала фармакотерапии картина ЭЭГ выглядела иначе, так как отмечались десинхронизация быстроволновой активности и изменения амплитуды ритмов ЭЭГ (табл. 2). Показатели ОЗМ α -ритма увеличивались по направлению от фронтального отведения к центральной области, в 1,8 и 1,4 раза превышая соответствующие значения в этих отведениях в группе К. В теменной области они достоверно уменьшались, а в затылочном отведении были на 64,2 % ($p < 0,01$) ниже исходных показателей. Одновременно с этим β -ритм также претерпел изменения: отмечалось уменьшение его показателей во всех регистрируемых зонах ГМ. Так, в области лба его ОЗМ снизилось в 7,9 раза ($p < 0,01$) по сравнению с показателями пациентов в группе К. Активность Δ -ритма выросла на 80 % ($p < 0,01$) во всех областях ГМ, а в затылочном и теменном отведениях Δ -ритм доминировал над α -ритмом. θ -ритм также усилился, но не так существенно, как Δ -ритм.

По окончании наблюдения, на 42-е сут фармакотерапии, показатели ОЗМ ЭЭГ-ритмов пациентов претерпели значительные изменения (табл. 2).

Анализ данных ЭЭГ-параметров обследуемых пациентов на фоне монотерапии флуоксетином показал, что биоэлектрическая активность ГМ в группе Ф практически приблизилась к показателям нормы, однако присутствовали некоторые отличия от результатов в группе К (здоровые люди) и в группе Д (пациенты до начала лечения) (табл. 2). По результатам применения флуоксетина можно утверждать, что он достоверно повлиял на мощность α -ритма, который стал доминировать в области затылка и теменной области, но при этом был ниже (в 1,4 раза ($p < 0,05$) и 1,2 раза ($p < 0,05$) соответственно) тех же показателей в группе К, а в центральной и фронтальной зонах достиг значений, достоверно не отличающихся от таковых у здоровых испытуемых в группе К. β -ритм также приблизился к значениям нормы, но его ОЗМ все еще были низкими в центральной и фронтальной областях. На Δ -ритм флуоксетин оказал иное влияние, нежели на α - и β -ритмы. Этот ритм сохранил высокие значения ОЗМ относительно нормы во всех регистрируе-

Таблица 2. Средние значения ОЗМ ЭЭГ-ритмов в группах К, Д, Ф и Ф+М на 42-е сут наблюдения

Локализация электродов	Ритмы ЭЭГ	Группа К	Группа Д	Группа Ф	Группа Ф+М
Затылочная область	Δ	$9,28 \pm 0,94$	$41,11 \pm 1,69^{**}$	$18,56 \pm 3,04^{***\#}$	$18,48 \pm 3,05^{***\#}$
	θ	$3,47 \pm 0,55$	$15,46 \pm 0,69^*$	$5,00 \pm 0,71^{\#}$	$3,48 \pm 1,17^{\#}$
	α	$76,24 \pm 5,55$	$25,70 \pm 2,00^{**}$	$58,21 \pm 6,11^{***\#}$	$59,28 \pm 5,05^{***\#}$
	β	$11,65 \pm 4,27$	$19,37 \pm 0,98$	$13,97 \pm 1,96^*$	$11,71 \pm 2,62^*$
Теменная область	Δ	$7,36 \pm 0,53$	$37,61 \pm 1,68^*$	$15,86 \pm 2,29^{**\#}$	$18,35 \pm 1,09^{***\#}$
	θ	$6,17 \pm 0,48$	$16,10 \pm 0,52^*$	$6,98 \pm 0,57^{\#}$	$6,71 \pm 1,76^{\#}$
	α	$59,12 \pm 3,87$	$25,72 \pm 3,03^{**}$	$52,48 \pm 7,71^{\#}$	$46,27 \pm 4,92^{\#}$
	β	$26,88 \pm 2,32$	$22,19 \pm 1,53$	$18,00 \pm 2,33$	$17,25 \pm 2,78^*$
Центральная область	Δ	$5,20 \pm 0,67$	$30,53 \pm 1,97^*$	$19,83 \pm 3,14^{***\#}$	$14,25 \pm 2,06^{***\#}$
	θ	$4,54 \pm 0,60$	$8,49 \pm 0,78^*$	$5,43 \pm 1,44$	$5,19 \pm 0,94^{\#}$
	α	$33,06 \pm 3,38$	$46,26 \pm 2,09^*$	$35,53 \pm 5,07^{\#}$	$37,89 \pm 5,82$
	β	$57,88 \pm 1,49$	$14,80 \pm 1,15^{**}$	$41,21 \pm 5,05^{***\#}$	$39,67 \pm 5,23^{***\#}$
Фронтальная область	Δ	$6,21 \pm 0,61$	$36,86 \pm 2,34^{**}$	$12,61 \pm 1,60^{***\#}$	$17,57 \pm 3,34^{***\#}$
	θ	$4,09 \pm 0,47$	$7,29 \pm 0,81^*$	$4,15 \pm 1,11$	$6,32 \pm 0,70$
	α	$25,28 \pm 3,85$	$47,68 \pm 1,61^{**}$	$26,31 \pm 3,28^{\#}$	$21,37 \pm 3,82^{\#}$
	β	$64,90 \pm 2,90$	$8,17 \pm 1,08^{**}$	$55,97 \pm 8,18^{\#}$	$47,52 \pm 5,26^{***\#}$

Примечание. Статистически достоверные различия ОЗМ ЭЭГ-ритмов пациентов групп Д (до лечения), Ф (пациенты, получавшие флуоксетин) и Ф+М (пациенты, получавшие комбинацию флуоксетина и мелатонина) относительно ОЗМ ЭЭГ-ритмов пациентов группы К (здоровые люди) при * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$. Статистически достоверные различия ОЗМ ЭЭГ-ритмов пациентов групп Ф и Ф+М относительно ОЗМ ЭЭГ-ритмов пациентов группы Д при # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$.

мых зонах вдвое ($p < 0,01$) на всем протяжении наблюдения. В свою очередь, θ -ритм уменьшился до нормы, и более колебаний его мощности не наблюдалось.

Аналогичная картина распределения ЭЭГ-ритмов наблюдалась у пациентов, которые получали комбинированную терапию двумя препаратами (группа Ф+М) (табл. 2). Так, на 42-е сут фармакотерапии на фоне правильного распределения α -ритма были зарегистрированы достоверно более низкие значения его ОЗМ в области затылка и темени по сравнению с таковыми у здоровых испытуемых в группе К.

β -ритм соответствовал показателям нормы только в затылочном и теменном отведениях, а в центральной и фронтальной областях сохранялись низкие показатели его ОЗМ. Значения δ -ритма в 2–3 раза превышали результаты, полученные для пациентов группы К, во всех регистрируемых зонах, а θ -ритм достиг значений до лечения на 14-е сут, и больше его изменений не наблюдалось.

Подводя итоги результатов проведенного исследования, можно резюмировать, что согласно показателям шкалы HDRS-17 уже на 28-е сут наблюдения терапевтический эффект был достигнут у пациентов, которые принимали комбинацию флуоксетина с мелатонином. На фоне монотерапии флуоксетином подобные результаты отмечались лишь на 42-е сут лечения менее чем у половины пациентов, при этом остальным пациентам требовалось продолжение наблюдения и приема ЛП. Анализ ОЗМ ГМ пациентов методом количественной фарма-

ко-ЭЭГ показал, что восстановление нормальных значений ритмов ЭЭГ на фоне комбинации флуоксетина с мелатонином происходит с небольшим опережением, чего нельзя сказать о монотерапии флуоксетином, прием которого не привел к полной ремиссии текущего депрессивного эпизода у ряда пациентов при лечении в течение 42 сут.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Прием комбинации флуоксетина с мелатонином способствует более быстрому регрессу депрессивной симптоматики и достижению уровня ниже 7 баллов согласно данным шкалы HDRS-17, что соответствует наступлению ремиссии ДР уже на 28-е сут наблюдения более чем у половины пациентов, в отличие от приема одного флуоксетина, в случае которого 40 % пациентов даже на 42-е сут еще нуждались в продолжении лечения и наблюдения.

2. В результате использования метода количественной фармако-ЭЭГ было показано, что флуоксетин способствует некоторому восстановлению α -ритма в затылочной области, а β -ритма во фронтальном отведении, однако не в полной мере по сравнению со здоровыми испытуемыми в группе К.

3. Фармако-ЭЭГ анализ ОЗМ в группе Ф+М продемонстрировал, что восстановление нормальных значений ритмов ЭЭГ на фоне комбинации флуоксетина с мелатонином более значимое и происходит с небольшим опережением по сравнению с показателями монотерапии флуоксетином.

4. Полученные результаты позволяют констатировать, что применение комбинации флуоксетина с мелатонином при комплексном лечении пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта, отягощенной ДР средней степени тяжести, способствует более быстрому излечению сопутствующей психотической патологии в отличие от приема одного флуоксетина.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

At present depressive disorders (DDs) are quite widespread in both the developing and developed countries. This is a rather serious psychoemotional disorder which affects up to 21 % of people around the world [1]. According to clinical studies, the number of depressed patients among patients with a chronic somatic disease amounts to 22–33 % and leaves behind such a widespread condition as arterial hypertension [2]. The most widespread chronic diseases with recurrent somatic symptoms are gastrointestinal diseases. They may be accompanied by affective disorders capable of producing and sustaining somatic symptoms [3, 4].

The challenges associated with DD pharmacotherapy are quite pressing despite a wide range of existing antidepressant medicines [5]. The use of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), as compared to tricyclic antidepressants, has a number of advantages in practical terms: safe use, better tolerability and the possibility of targeted treatment of the underlying cause of the psychiatric condition. At present one of the major medicines among SSRIs is fluoxetine [6].

In order to improve the efficacy of pharmacotherapy, SSRIs are often used in combination with other types of medicines. The literature describes the use of antidepressants in combination with antipsychotic medicines [7]. Combination therapy of DD may benefit from the use of a pineal hormone — melatonin (MT) which ensures nonspecific protection against stress and regulates circadian rhythms [8].

Analysis of the brain electrical activity is a highly specific tool for studying the neurobiology of mental impairment in the context of various central nervous system disorders [9, 10]. One of the most informative methods of assessing the efficacy of psychotropic medicines is quantitative pharmaco-electroencephalography (pharmaco-EEG). This non-invasive technique is helpful for analysis of psychotropic medicines activity and monitoring the efficacy of pharmacotherapy [11–13].

The aim of the present paper is to perform comparative assessment of the efficacy of modern antidepressants used for the treatment of moderate somatic DD by quantitative pharmaco-EEG.

MATERIALS AND METHODS

Forty seven subjects took part in the study. The study was approved by the Regional Independent Ethics Committee (RIEC) of Rostov State Medical University (extract from the minutes of the RIEC meeting No. 34 of 7 July 2011).

The control (C) group included presumably healthy subjects ($n = 17$). The D group ($n = 30$) comprised patients with confirmed DD. The diagnosis of DD was made based on clinical examination according to the ICD-10 classification criteria, and the severity of the disorder was assessed using the 17-item Hamilton Scale (HDRS-17).

The patients included into the D group were further subdivided into two clinical groups depending on the prescribed pharmacotherapy regimen: the patients in the F group ($n = 15$) took fluoxetine (a single dose of 20 mg/day), and the patients in the F+M group ($n = 15$) took fluoxetine (a single dose of 20 mg/day) and melatonin (a single dose of 3 mg/day one hour prior to bedtime).

Before the treatment the mean HDRS-17 score of the patients in both clinical groups was equivalent to moderate DD: 19.6 ± 2.5 scores in the F group, and 19.3 ± 2.1 scores in the F+M group.

The patients who took any psychotropic medicines in the pretreatment period did not take any drugs for seven days prior to initiating therapy in order to rule out the possibility of drug interaction. None of the patients received any psychotherapy.

The efficacy of the therapy was assessed by comparing the HDRS-17 scores before the treatment, and on the 14th, 28th, and 42nd days of the treatment, as well as by comparing the quantitative pharmaco-EEG data obtained before the treatment and on the 42nd day of the treatment. Electroencephalograms (EEGs) of the patients were recorded using an electroencephalograph-analyser EEGA-21/26 «Encephalan 131-03» (Russia) with 8 channels. The relative power (RP, %) was computed in the δ (delta, 1–4 Hz), θ (theta, 5–7 Hz), α (alpha, 8–12 Hz), and β (beta, 13–30 Hz) EEG frequency bands. The statistical significance of differences in the RP of EEG rhythms in patients belonging to the C, D, F and F+M groups was assessed using Student's *t*-test and the significance levels $p < 0.05$ and $p < 0.01$.

RESULTS AND DISCUSSION

The patients who took both fluoxetine and melatonin (the F+M group) said they were feeling better on the 14th day of the treatment, but they still had complaints about low mood. When interviewed they complained of difficulties falling asleep and early awakening, but they did not complain of nocturnal awakening. They still had complaints about fatigue, weakness, decreased libido, reduced appetite or loss of appetite, heaviness in the stomach, weight loss.

On the 28th day of the treatment more than half of the patients belonging to this group voiced a much lower number of complaints and reached the threshold level by scoring 7 or less on the HDRS-17 scale, which was regarded as remission of the depressive episode.

The patients of the F group said they started to feel better only on the 28th day of the treatment, and their mean HDRS-17 score decreased 1.7 times ($p < 0.01$). Some patients continued to complain of seemingly unfounded fatigue, weakness, low mood, decreased libido. There still remained a problem with falling asleep and anxiety caused by early awakening, but the patients were

less worried about insomnia and less preoccupied with their health problems.

The patients of the clinical groups continued to have a positive response to DD therapy at a later stage. On the 42nd day of the treatment the mean score in the F group decreased 2.5 times ($p < 0.01$), and in the F+M group — 3.6 times ($p < 0.01$) as compared to the initial mean score before initiation of treatment (table 1).

At the end of the monitoring period all patients in the F+M group reached the threshold level of less than 7 scores on the HDRS-17 scale, and, in general, all of them felt fine, however during interviews some of them still complained of decreased libido.

Sixty percent of the patients in the F group had a HDRS-17 score equivalent to mild depression (7–16 scores), and the rest scored below 7. At the same time most patients in this group still had some DD symptoms, such as occasional impaired productivity and fatigue. Some patients still had problems with early awakening and difficulties falling asleep again, they also had some manifestations of somatic anxiety related to their health problems.

Thus, at the end of the 42-day course of DD treatment the patients in the clinical F+M group demonstrated sustained improvement in the existing affective state, which is not the case with the patients of the F group who took fluoxetine alone — they still needed care and continuation of pharmacotherapy.

The severity of DD was assessed using the HDRS-17 scale and, in addition, judging by the EEG readings. The assessment of the RP of EEG rhythms in different brain areas gave a fuller picture of the pharmacotherapy ef-

Table 1. Changes in manifestation of depression in the patients of the clinical groups according to the HDRS-17 scale

Patient visits	Patient groups	
	F	F+M
	Scores	
Before initiation of treatment	19.6 ± 2.5	19.3 ± 2.06
14 day	15.7 ± 1.6*	12.5 ± 2.3*
28 day	11.6 ± 2**	8.4 ± 1.2**
42 day	7.9 ± 1.5**	5.4 ± 0.9**

Note. Statistically significant differences between treatment outcomes and pretreatment data for * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$.

fect on the bioelectric activity of the brain. The obtained data were compared to the results of the control C and D groups.

Alpha rhythms normally dominate in the back of the head in a healthy person (C group) and tend to subside closer to the frontal lobes. Beta rhythms, by contrast, are predominant in the frontal and central areas of the brain [10]. This distribution of RP was observed in the C group (table 2).

However, the EEG pattern of the patients with confirmed DD before initiation of treatment (D group) was different, it showed desynchronization of fast rhythms and changes in the amplitude of EEG rhythms (table 2). The RPs of alpha rhythms increased from the frontal area towards the central area and were 1.8 and 1.4 times higher than the corresponding values for these areas in the C

Table 2. Mean RP values of EEG rhythms in the C, D, F and F+M groups on the 42nd day of treatment

Electrode location	EEG rhythms	C group	D group	F group	F+M group
Occipital region	Δ	9.28 ± 0.94	41.11 ± 1.69**	18.56 ± 3.04***	18.48 ± 3.05***
	θ	3.47 ± 0.55	15.46 ± 0.69*	5.00 ± 0.71**	3.48 ± 1.17**
	α	76.24 ± 5.55	25.70 ± 2.00**	58.21 ± 6.11***	59.28 ± 5.05***
	β	11.65 ± 4.27	19.37 ± 0.98	13.97 ± 1.96*	11.71 ± 2.62*
Parietal region	Δ	7.36 ± 0.53	37.61 ± 1.68*	15.86 ± 2.29***	18.35 ± 1.09***
	θ	6.17 ± 0.48	16.10 ± 0.52*	6.98 ± 0.57**	6.71 ± 1.76**
	α	59.12 ± 3.87	25.72 ± 3.03**	52.48 ± 7.71**	46.27 ± 4.92**
	β	26.88 ± 2.32	22.19 ± 1.53	18.00 ± 2.33	17.25 ± 2.78*
Central region	Δ	5.20 ± 0.67	30.53 ± 1.97*	19.83 ± 3.14***	14.25 ± 2.06***
	θ	4.54 ± 0.60	8.49 ± 0.78*	5.43 ± 1.44	5.19 ± 0.94*
	α	33.06 ± 3.38	46.26 ± 2.09*	35.53 ± 5.07*	37.89 ± 5.82
	β	57.88 ± 1.49	14.80 ± 1.15**	41.21 ± 5.05***	39.67 ± 5.23***
Frontal region	Δ	6.21 ± 0.61	36.86 ± 2.34**	12.61 ± 1.60***	17.57 ± 3.34***
	θ	4.09 ± 0.47	7.29 ± 0.81*	4.15 ± 1.11	6.32 ± 0.70
	α	25.28 ± 3.85	47.68 ± 1.61**	26.31 ± 3.28**	21.37 ± 3.82**
	β	64.90 ± 2.90	8.17 ± 1.08**	55.97 ± 8.18**	47.52 ± 5.26***

Note. Statistically significant differences in the RP of EEG rhythms in the patients of the D group (before initiation of treatment), F group (fluoxetine monotherapy) and F+M group (fluoxetine and melatonin combination therapy) as compared to the RP of EEG rhythms in the patients of the C group (healthy subjects) for * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$. Statistically significant differences in the RP of EEG rhythms in the patients of the F and F+M groups as compared to the RP of EEG rhythms in the patients of the D group for # — $p < 0.05$; ## — $p < 0.01$.

group. There was a significant reduction in the power of alpha rhythms in the parietal region, and a 64.2 % decrease ($p < 0.01$) in occipital alpha rhythms as compared to the initial data. The beta rhythm also underwent some changes: it decreased in all analysed areas of the brain, in particular, its RP was 7.9 times lower ($p < 0.01$) in the frontal region as compared to that of the patients in the C group. The delta power increased 80 % ($p < 0.01$) in all analysed areas of the brain, and it was even more prominent than the alpha rhythm in the occipital and parietal regions. The theta rhythm also increased, but to a lesser extent than the delta rhythm.

At the end of the treatment period (on day 42) the RP values of patient EEG rhythms changed considerably (table 2).

The analysis of EEG parameters of the patients receiving the fluoxetine monotherapy showed that the bioelectric activity of the brain in the F group was very close to normal, however it differed a little from that of the patients in the C group (healthy subjects) and D group (patients before initiation of treatment) (table 2). The administration of fluoxetine had a significant effect on the power of the alpha rhythm which began to dominate in the occipital and parietal regions, but at the same time it was 1.4 times ($p < 0.05$) and 1.2 times ($p < 0.05$) lower than that of the patients in the C group, respectively. As for the central and frontal regions, the alpha rhythm reached a level showing no statistically significant differences with that of the patients in the C group of healthy subjects. The beta rhythm was also close to normal, but its RPs were still rather low in the central and frontal regions of the brain. Fluoxetine had a different effect on the delta rhythm than on alpha or beta rhythms. The RPs of the delta rhythm remained at a level twice as high as the norm ($p < 0.01$) in all the analysed regions all through the period of treatment. The theta rhythm dropped to the normal level and did not show any fluctuations thereafter.

A similar pattern of EEG rhythm distribution was observed in the patients who received the combination therapy with two drugs (the F+M group) (table 2). For instance, on the 42nd day of the pharmacotherapy, the RP values of the alpha rhythm (given its normal distribution) were found to be lower in the occipital and parietal regions of the brain than those in the C group of healthy subjects.

The beta rhythm complied with the norm only in the occipital and parietal regions, but its RP values remained at a low level in the central and frontal regions. The delta rhythm values were two or three times as high in all of the analysed regions as the corresponding values in the C group, and the theta rhythm reached the pretreatment level on the 14th day of the treatment and showed no changes afterwards.

Summarising the results of the study it may be concluded that according to the HDRS-17 scale the therapeutic effect was achieved in the patients, who received the combination therapy with fluoxetine and melatonin, already on the 28th day of the treatment. At the same time less than half of the patients who received the monotherapy with fluoxetine showed a similar response on the 42nd day of the treatment, and the rest of the patients in the latter group needed further care and continuation of

the pharmacotherapy. The analysis of EEG RP by pharmacology-EEG demonstrated quite fast restoration of normal EEG rhythms in the patients who took fluoxetine and melatonin, which is not the case with the fluoxetine monotherapy, which did not result in complete remission of the existing depressive episode in a number of patients after the 42-day treatment course.

CONCLUSION

1. The administration of both fluoxetine and melatonin resulted in a more rapid regression of depressive symptoms and helped more than half of the patients score 7 or less on the HDRS-17 scale (which is equivalent to DD remission) already on the 28th day of the treatment. By contrast, 40 % of the patients who took fluoxetine alone still needed therapy and observation even on the 42nd day of the treatment.

2. Pharmacology-EEG helped to demonstrate that fluoxetine contributed to partial restoration of the alpha rhythm in the occipital region of the brain and beta rhythm in the frontal part of the brain, but not to the extent comparable to the healthy subjects in the C group.

3. Pharmacology-EEG analysis of RP values in the F+M group showed a more significant and a little more rapid restoration of normal EEG rhythms after treatment with fluoxetine and melatonin as compared to the fluoxetine monotherapy.

4. The obtained results indicate that the combination therapy with fluoxetine and melatonin used for patients with gastrointestinal diseases with comorbid moderate DD leads to a more rapid recuperation of concomitant psychoemotional disorder as compared to the fluoxetine monotherapy.

Acknowledgements. The study was performed with no external funding.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tomenson B, Essau C, Jacobi F, Ladwig KH, Leiknes KA, Lieb R, et al. Total somatic symptom score as a predictor of health outcome in somatic symptom disorders. *Br J Psychiatry*. 2013;203(5):373–80. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.112.114405>
2. Сафроненко АВ, Макляков ЮС, Соболева СЯ. Способы повышения эффективности лечения больных артериальной гипертензией. *Вестник новых медицинских технологий*. 2011;18(4):73–5. [Safronenko AV, Maklyakov YuS, Soboleva SYa. Ways of increasing the efficiency of treating patients with arterial hypertension. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*. 2011;18(4):73–5 (In Russ.)]
3. Собенников ВС, Прокопьева МЛ, Собенникова ВВ. К проблеме соматизированной депрессии (обзор литературы). *Психические расстройства в общей медицине*. 2013;(3):18–21. [Sobennikov VS, Prokopyeva ML, Sobennikova VV. To the problem of somatic depression (review). *Psikhicheskie rasstroystva v obshchey meditsine = Mental Illness in General Health Care*. 2013;(3):18–21 (In Russ.)]
4. Асланов АМ, Колмакова ТС. Содержание стероидных гормонов у больных желчнокаменной болезнью в зависимости от течения заболевания. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2016;(6):10–3. [Aslanov AM, Kolmakova TS. The content of steroid hormones in patients with a different course of cholelithiasis. *Kubansky nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2016;(6):10–13 (In Russ.)]
5. Смулевич АБ, Дубницкая ЭБ. Депрессия — актуальные проблемы систематики. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Кор-*

- сакова. 2012;112(11):11–20. [Smulevich AB, Dubnitskaya EB. Depression — topical problems of systematics. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova* = *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2012;112(11):11–20 (In Russ.)]
6. Wenthur CJ, Bennett MR, Lindsley CW. Classics in chemical neuroscience: Fluoxetine (Prozac). *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(1):14–23. <https://doi.org/10.1021/cn400186j>
7. Мосолов СН. Биологические механизмы развития рекуррентной депрессии и действия антидепрессантов: новые данные. *Психофармакотерапия депрессии*. 2011;(15):1–14. [Mosolov SN. Biological mechanisms of the development of recurrent depression and the action of antidepressants: new data. *Psikhofarmakoterapiya depressii* = *Psychopharmacotherapy of Depression*. 2011;(15):1–14 (In Russ.)]
8. Мендель ВЭ, Мендель АГ. Мелатонин: роль в организме и терапевтические возможности. Опыт применения препарата Мелаксен в российской медицинской практике. *Русский медицинский журнал*. 2010;18(6):336–41. [Mendel VE, Mendel AG. Melatonin: a role in the body and therapeutic possibilities. experience of using melaxen in russian medical practice. *Russkiy meditsinskiy zhurnal* = *Russian Medical Journal*. 2010;18(6):336–41 (In Russ.)]
9. Бочкарев ВК. Электроэнцефалографические исследования при пограничных состояниях. В кн.: Бочкарев ВК, Панюшкина СВ. *Пограничные психические расстройства*. М.: Медицина; 2000. С. 120–33. [Bochkarev VK. Electroencephalographic studies in borderline mental states. In: Bochkarev VK, Panyushkina SV. *Borderline Mental Disorders*. Moscow: Meditsina; 2000. P. 120–33 (In Russ.)]
10. Itil TM. The discovery of psychotropic drugs by computer analyzed cerebral bioelectrical potentials (CEEG). *Drug Dev Res*. 1981;1(4):373–407. <https://doi.org/10.1002/ddr.430010407>
11. Ганцгорн ЕВ, Хлопонин ДП, Макляков ЮС. Анализ выживаемости и частотно-пространственной организации ЭЭГ крыс при глобальной ишемии головного мозга. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2017;(2):43–9. [Gantsgorn EV, Khloponin DP, Maklyakov YuS. Survival analysis and spatial-frequency distribution of EEG-indices in rats' global cerebral ischemia. *Kubansky nauchny meditsinskiy vestnik* = *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2017;(2):43–9 (In Russ.)]
12. Bazanova OM, Aftanas LI. Individual measures of electroencephalogram alpha activity and non-verbal creativity. *Neurosci Behav Physiol*. 2008;38(3):227–35. <https://doi.org/10.1007/s11055-008-0034-y>
13. Kudelina OM, Khloponin DP, Maklyakov YuS, Zaika VG, Gantsgorn EV. Evaluation efficiency of modern antidepressants by means of quantitative pharmac-EEG. *Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology*. 2016;2(4):12–20. <https://doi.org/10.18413/2500-235X-2016-2-4-12-20>

ОБ АВТОРАХ

Куделина Оксана Михайловна, канд. мед. наук, ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии РостГМУ, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-3889-345X>

Макляков Юрий Степанович, д-р мед. наук, проф., заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии РостГМУ

Хлопонин Дмитрий Петрович, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии РостГМУ

Заика Владимир Григорьевич, д-р мед. наук, проф., заведующий кафедрой психиатрии РостГМУ

Ганцгорн Елена Владимировна, канд. мед. наук, ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии РостГМУ, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0627-8372>

Сафроненко Андрей Владимирович, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии РостГМУ

Статья поступила 15.01.2018
Принята к печати 22.08.2018

AUTHORS

Oksana M. Kudelina, Cand. Sci. (Med.), Assistant Lecturer of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology of the RostSMU, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-3889-345X>

Yury S. Maklyakov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology of the Rostov State Medical University

Dmitry P. Khloponin, Dr. Sci. (Med.), Assistant Professor, Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology of the RostSMU

Vladimir G. Zaika, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Psychiatry of the RostSMU

Elena V. Gantsgorn, Cand. Sci. (Med.), Assistant Lecturer of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology of the RostSMU, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0627-8372>

Andrey V. Safronenko, Dr. Sci. (Med.), Assistant Professor, Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology of the RostSMU

Article was received 15 January 2018
Accepted for publication 22 August 2018

Исключение ложных результатов микробиологического анализа лекарственных средств

И. А. Буйлова*, Н. Г. Сахно, Г. М. Булгакова, О. В. Гунар

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Достоверность результатов определения микробиологической чистоты лекарственных средств невозможна без доказательства пригодности используемой методики испытания. **Цель работы:** изучение факторов, влияющих на получение ложных результатов исследования микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств, и определение путей их устранения. **Материалы и методы:** объектами исследования были нестерильные лекарственные средства, предварительно исследованные на микробиологическую чистоту: N-метилглюкамин; L-яблочная кислота; ксероформ; финголимода гидрохлорид; янтарная кислота; стрептоцид; арипипразол; доксазозин; клопидогрел; моксонидин; тилорон; микофеноловая кислота; фолиевая кислота; габапентин; дутастерид; иматиниб; темозоломид. Для исследований использовали тест-штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Aspergillus brasiliensis*, реактивы, питательные среды и методы — определения антимикробного действия в условиях испытания микробиологической чистоты, модифицированный глубинный метод определения микробиологической чистоты ЛС в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII изд. **Результаты:** на основании анализа данных литературы выявлены основные причины возникновения ложных результатов микробиологических испытаний и выбраны пути их предотвращения. Представлены результаты экспериментального сравнения двух вариантов приготовления твердых лекарственных форм: стандартного по Государственной фармакопее Российской Федерации XIII изд. и с использованием встряхивателя лабораторного. Экспериментально обоснованы особенности устранения антимикробного действия в отношении *B. subtilis* и *B. cereus* и использования специфических инактиваторов для отрицательных результатов исследования должна включать: контроль стерильности используемых питательных сред, реактивов, мониторинг помещений; контроль ростовых свойств и селективности питательных сред; выбор подходящих условий инкубации и методики посева с учетом лекарственной формы препарата; обоснование используемого количества образца, растворителя и фактора разведения; учет антимикробного действия лекарственного средства.

Ключевые слова: микробиологическая чистота; нестерильные лекарственные препараты; ложноотрицательные результаты; антимикробное действие; микроорганизмы

Для цитирования: Буйлова ИА, Сахно НГ, Булгакова ГМ, Гунар ОВ. Исключение ложных результатов микробиологического анализа лекарственных средств. *Ведомости Научного Центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):187–192. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-187-192>

***Контактное лицо:** Буйлова Ирина Александровна; Builova@expmed.ru

Elimination of False Results of Medicines Microbiological Testing

I. A. Buylova*, N. G. Sakhno, G. M. Bulgakova, O. V. Gunar

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

The validity of medicines microbial quality testing relies on the adequacy of the test procedure employed. **The aim of the study** was to analyse factors triggering false results during microbial quality testing of non-sterile medicinal products, as well as to find ways of their elimination. **Materials and methods:** the study was focused on non-sterile medicinal products tested for microbial quality: N-methylglucamine, L-Malic acid, Xeroform, *Fingolimod hydrochloride*, Succinic acid, Streptocide, Aripiprazole, Doxazosin, Clopidogrel, Moxonidine, Tilorone, Mycophenolic acid, Folic acid, Gabapentin, Dutasteride, Imatinib, Temozolomide. The study involved the use of the following test strains: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Aspergillus brasiliensis*, as well as of reagents and growth media. The methods used were determination of antimicrobial activity under conditions of microbial quality testing, and modified in-depth testing of microbial quality of medicinal products according to the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th edition. **Results:** the analysis of literature sources helped reveal the main factors causing false results of microbiological testing and determine ways of their elimination. The article sets forth the results of experimental comparison of two ways of sample preparation for solid formulations: the standard one described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th edition, and the one involving the use of a laboratory shaker. The article provides experimental data on specific aspects of elimination of antimicrobial activity against *B. subtilis* and *B. cereus* and the use of specific inactivators for particular medicinal products. **Conclusions:** a set of measures aimed at prevention of false-positive and false-negative testing results should include: sterility control of the growth media and reagents used, monitoring of facilities; control of growth promotion properties and selectivity of the growth media; selection of adequate incubation conditions and inoculation procedure with due regard to the dosage form; justification of the amount of sample, diluents and dilution factor used; consideration of the antimicrobial activity of a medicinal product.

Key words: microbial quality; non-sterile medicinal products; false-negative results; antimicrobial activity; microorganisms

For citation: Buylova IA, Sakhno NG, Bulgakova GM, Gunar OV. Elimination of false results of medicines microbiological testing. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(3):187–192. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-187-192>

*Corresponding author: Irina A. Buylova; Builova@expmed.ru

Микробиологическая чистота — важный показатель безопасности нестерильных лекарственных средств (НЛС). Одним из наиболее важных аспектов при определении качества НЛС по микробиологическим показателям является исключение ложных результатов исследования [1].

Наличие микроорганизмов в образце может существенно повлиять на их терапевтическую ценность, начиная со стабильности, заканчивая потенциальной опасностью для здоровья человека из-за токсигенных, аллергенных, а иногда и канцерогенных свойств некоторых видов бактерий и грибов, а также метаболитов [2].

Для исключения микробной контаминации в испытуемом образце необходимо экспериментальное доказательство пригодности микробиологической методики и анализ потенциальной возможности получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов [3].

Под ложноположительными результатами микробиологических испытаний подразумевают обнаружение признаков роста микроорганизмов на питательных средах при фактическом их отсутствии в образце. Ложноотрицательные результаты означают отсутствие признаков роста микроорганизмов на питательных средах несмотря на их фактическое наличие в образце.

Цель работы — изучение факторов, влияющих на получение ложных результатов исследования микробиологической чистоты НЛС, и определение путей их устранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Объектами исследования были следующие лекарственные средства (ЛС):

- в виде субстанций: N-метилглюкамин; L-яблочная кислота; ксероформ; финголимода гидрохлорид; янтарная кислота;
- в форме порошка: стрептоцид, порошок для наружного применения;
- в форме таблеток: арипипразол; доксазозин; клопидогрел; моксонидин; тилорон; микофеноловая кислота; фолиевая кислота;
- в форме капсул: габапентин; дутастерид; иматиниб; темозоломид.

2. Тест-штаммы микроорганизмов:

- *Bacillus subtilis* (BGA) суспензия спор ATCC 6633 («Мерк», Германия);
- *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739 и *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 Bio-Ball® («биоМерье», Франция);
- *Bacillus cereus* ATCC 10702 вегетативные формы (Центр экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России).

3. Питательные среды и реактивы:

- раствор натрия хлорида 0,9 %;
- триптиказо-соевая среда (TSA);
- среда Сабура (SDCA);
- фосфатно-буферный раствор;
- нейтрализующая жидкость;
- подкисленная пептонная вода (в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 г пептона, 4,3 г натрия хлорида, доводят объем водой очищенной до метки и растворяют. Добавляют 80 мл хлористоводородной кислоты в разведении 1:1 (1 часть воды очищенной и 1 часть хлористоводородной кислоты концентрированной плотностью 1,19 г/см³), стерилизуют;
- щелочная пептонная вода с pH 8,6 (в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 г пептона, 68,0 г натрия гидроксида, 4,3 г натрия хлорида, растворяют при подогреве, доводят объем раствора водой очищенной до метки), стерилизуют.

4. Оборудование: инкубаторы («Биндер ГмБХ», Германия); ламинарный шкаф («Labconco», USA); счетчик колоний Scan 100 («Interscience», France), встряхиватель лабораторный IKA KS 501 digital, («IKA®-Werke GmbH», Germany).

5. Расходные стерильные материалы: пипетки, чашки Петри, пробирки, флаконы.

Для исследований использовали методы Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII изд. (ГФ XIII): определения антимикробного действия в условиях испытания микробиологической чистоты; модифицированный глубинный метод определения микробиологической чистоты ЛС [6].

Рассчитывали отношение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в исследуемой группе НЛС (в присутствии ЛС) к количеству КОЕ в контрольной группе (без ЛС), выраженное в процентах (коэффициент восстановления), по формуле

$$R = \frac{N}{N_0} \times 100 \%, \quad (1)$$

где: N — количество колоний, выделенных в ходе анализа, КОЕ; N_0 — количество внесенных клеток микроорганизмов, КОЕ; R — коэффициент восстановления жизнеспособных микроорганизмов, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исключения ложноположительных и ложноотрицательных результатов микробиологических испытаний был проведен анализ причин возникновения и необходимых мероприятий для их предотвращения (табл. 1).

Таблица 1. Виды, причины и меры предотвращения ложных результатов микробиологических испытаний лекарственных средств

Table 1. Types, causes and ways of prevention of false results of medicines microbiological testing

Причины возникновения	Меры предотвращения
Ложноположительные результаты	
Нестерильность применяемых питательных сред, материалов, реактивов	Контроль стерильности и подтверждение эффективности стерилизации
Окружающая среда (воздух, поверхности, одежда и др.)	Микробиологический мониторинг условий окружающей среды
Человеческий фактор (профессиональная подготовка, актуализированные рабочие инструкции и др.)	Обучение, пересмотр и обновление рабочих инструкций
Ложноотрицательные результаты	
Ростовые и селективные свойства питательных сред	Контроль качества используемых питательных сред
Условия инкубации посевов ЛС	Мониторинг температуры инкубаторов
Методика посева	Выбор методики и ее верификация
Лекарственная форма испытуемого образца	Анализ данных о растворимости ЛС в водных растворителях
Антимикробное действие ЛС	Определение антимикробного действия и способов его устранения
Пробоподготовка (количество ЛС, растворитель, разведение)	Использование растворителя, разведения ЛС и обоснование используемого количества пробы (в случае нестандартного подхода)
Учет результатов	Обучение, повышение квалификации персонала

Ложноположительные результаты микробиологического анализа качества ЛС возможно минимизировать и/или исключить путем отрицательных контролей, подразумевающих проверку стерильности сред, реактивов и материалов. Основными рисками, оказывающими влияние на ложноположительные результаты микробиологического исследования, являются: воздух, персонал, поверхности, правильность работы стерилизационного оборудования. Ложноположительные результаты исключаются путем соответствующего мониторинга помещений [4, 5].

Анализируя причины возникновения ложноотрицательных результатов испытаний (табл. 1), следует заключить, что они могут быть устранены за счет применения эффективной питательной среды и оптимизации условий проведения испытания исследуемого образца [4]. В настоящее время согласно ГФ XIII срок инкубации питательных сред с посевами ЛС составляет 5 сут вне зависимости от метода испытания, при температуре $32,5 \pm 2,5$ °C для количественного определения аэробных микроорганиз-

мов и $22,5 \pm 2,5$ °C для подсчета дрожжевых и плесневых грибов [6].

Контаминанты ЛС подвергаются воздействию химических соединений, входящих в состав препарата, и различных факторов технологического процесса, оказывающих влияние на микроорганизмы. Для выделения потенциально поврежденных микроорганизмов необходимо учитывать способность клеток образовывать колонии на неселективной питательной среде, при отсутствии роста на селективных средах, и увеличение фазы роста поврежденных клеток по сравнению с нормальными [7]. Таким образом, угнетенные клетки могут присутствовать в образце, но не образовывать видимого роста, что создает угрозу получения ложноотрицательных результатов. Эффективным способом восстановления угнетенных микроорганизмов является использование накопительной питательной среды. Особое значение имеет выбор метода количественного определения микроорганизмов. Согласно ГФ XIII могут быть использованы:

- чашечные методы (глубинный, двухслойный, поверхностный, модифицированный глубинный);
- метод мембранной фильтрации;
- метод наиболее вероятных чисел (НВЧ).

Для получения достоверных результатов исследования необходимо учитывать лекарственную форму образца. Испытание различных лекарственных форм по микробиологическим показателям связано с распределением микроорганизмов в пробе. Существуют данные о том, что твердые частицы снижают возможность выделения микроорганизмов [8], повышая риск получения недостоверных результатов. Таким образом, необходимо оптимизировать выделение микроорганизмов из твердых лекарственных форм (таблетки, капсулы).

Для этого был выполнен эксперимент по сравнению результатов анализа после стандартной пробоподготовки по ГФ XIII и результатов после пробоподготовки с использованием встряхивателя лабораторного. Образцы, предварительно исследованные на микробиологическую чистоту, не содержащие микроорганизмов-контаминантов, инокулировали смесью тест-штаммов в теоретическом количестве от 50 до 100 КОЕ/г перед растворением. Процедура выделения микроорганизмов полностью воспроизводила процесс испытания по показателю «Микробиологическая чистота» с использованием аналогичной подготовки образцов, питательных сред и лабораторного оборудования. Образцы растворяли в буферном растворе в соотношении 1:10, и встряхивали в течение 15–30 минут с частотой встряхивания 120 об/мин. После посевов чашечным агаровым методом образцы инкубировали при температуре $32,5 \pm 2,5$ °C в течение 5 суток. Производили подсчет микроорганизмов по окончании инкубации.

Для группы образцов, пробоподготовка которых проводилась с применением встряхивателя, критерий приемлемости выполнялся во всех случаях: процент восстановления микроорганизмов составлял 70–123 %. Для образцов, пробоподготовка которых выполнялась по стандартной методике ГФ XIII,

Таблица 2. Коэффициент восстановления микроорганизмов, выделенных из нестерильных лекарственных средств**Table 2.** Regeneration rate of microorganisms obtained from non-sterile medicinal products

Наименование препарата	Пробоподготовка по ГФ XIII				Пробоподготовка с использованием встряхивателя			
	Наименование питательной среды							
	TSA (триптиказо-соевый агар)		SDCA (Агар Сабуро)		TSA (триптиказо-соевый агар)		SDCA (Агар Сабуро)	
	Тест-штаммы (KOE, $X_{cp} \pm \Delta X$), Коэффициент восстановления (%)							
	<i>A.b.</i>	<i>C.a. B.s. E.c. (смесь)</i>	<i>A.b.</i>	<i>C.a.</i>	<i>A.b.</i>	<i>C.a. B.s. E.c. (смесь)</i>	<i>A.b.</i>	<i>C.a.</i>
Арипипразол, таблетки	17 ± 4 89	24 ± 0,5 38	20 ± 3 107	17 ± 2 53	23 ± 0,5 123	48 ± 2 75	23 ± 3 121	23 ± 1 73
Контроль культуры	19 ± 3	64 ± 10	19 ± 1	32 ± 1	19 ± 3	64 ± 10	19 ± 3	32 ± 1
Габапентин, капсулы	53 ± 8 50	48 ± 2 54	52 ± 6 65	15 ± 1 83	78 ± 1,5 75	74 ± 1,5 84	60 ± 5 75	15 ± 1 93
Контроль культуры	104 ± 6	88 ± 3	80 ± 1	16 ± 1	104 ± 6	88 ± 3	80 ± 1	16 ± 1
Моксонидин, таблетки	42 ± 2 95	30 ± 3,5 67	34 ± 6 80	12 ± 1 50	55 ± 2 125	38 ± 2 87	40 ± 2 90	18 ± 2 75
Контроль культуры	44 ± 6	45 ± 3	44 ± 6	24 ± 2	44 ± 6	45 ± 3	44 ± 6	24 ± 2
Фолиевая кислота, таблетки	19 ± 1 100	30 ± 6 46	16 ± 2 86	25 ± 1 80	21 ± 1 110	45 ± 5 70	19 ± 1 100	31 ± 1 96
Контроль культуры	19 ± 3	64 ± 10	19 ± 1	32 ± 1	19 ± 3	64 ± 10	19 ± 3	32 ± 1

Примечание. *A.b.* — *Aspergillus brasiliensis*, *C.a.* — *Candida albicans*, *B.s.* — *Bacillus subtilis*, *E.c.* — *Escherichia coli*, $X_{cp} \pm \Delta X$ — среднее количество КОЕ.

отмечался разброс результатов 38–107 %. При этом на среде TSA (триптиказо-соевый агар) отмечено пять случаев, когда результат был ниже критерия приемлемости (процент восстановления более 70 % является критерием приемлемости используемой методики согласно Европейской фармакопее [9]).

В таблице 2 представлены результаты оценки восстановления микроорганизмов из твердых лекарственных форм с учетом предварительного разведения препарата 1:10 согласно схеме испытания.

Если исследуемый препарат оказывает ингибирующее действие на микроорганизмы, которые выявляют в НЛС, это действие должно быть нейтрализовано во избежание ложной оценки результатов испытания на микробиологическую чистоту [10]. Необходимость проведения данного этапа продемонстрирована различными авторами [4].

В ходе рутинного контроля по определению микробиологической чистоты был накоплен материал по антимикробному действию различных НЛС. Было отмечено, что антимикробное действие в отношении *B. subtilis* и *B. cereus* снимается не одинаково. Для нейтрализации его действия в отношении спор *B. subtilis* необходимы большие разведения препарата. Очевидно, это обусловлено биохимической природой тест-штамма, которая имеет отличия от вегетативных клеток *B. cereus*, выращенных в течение 5 сут инкубации в стандартных условиях [11].

В таблице 3 приведены результаты исследования по сравнению антимикробного действия в отношении *B. subtilis* и *B. cereus*.

Таблица 3. Результаты сравнительных исследований по устранению антимикробного действия лекарственного средства**Table 3.** Results of comparative studies of elimination of antimicrobial activity of medicinal products

Наименование НЛС	Тест-штамм	
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
	Разведение ЛС, при котором нейтрализуется антимикробное действие	
Доксазозин, таблетки	1:50	1:10
Дутастерид, капсулы	1:500	1:100
Иматиниб, капсулы	1:100	1:10
Клопидогрел, таблетки	1:50	1:10
Ксероформ, субстанция	1:1000	1:10
Тилорон, таблетки	1:500	1:100
Стрептоцид, порошок	1:50	1:10
Темозоломид, капсулы	1:1000	1:100
Микофеноловая кислота, таблетки	1:100	1:50
Финголимода гидрохлорид, субстанция	1:500	1:100

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности проведения сравнительных исследований антимикробного действия в отношении

штаммов *B. subtilis* и *B. cereus* для исключения ложноотрицательных результатов исследования.

При анализе микробиологической чистоты во избежание ложноотрицательных результатов особое внимание необходимо уделять пробоподготовке образцов, а именно растворению образца путем встряхивания.

Согласно ГФ XIII при оценке микробиологической чистоты ЛС используют [6]:

- 10 г (мл) для определения общего количества аэробных микроорганизмов и выделения *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*,
- 10 г (мл) — для энтеробактерий, устойчивых к желчи,
- 10 или 25 г (мл) — для выделения бактерий рода *Salmonella*.

Разработаны методики по уменьшению количества образца. Однако для того чтобы изменение количества пробы не стало причиной получения ложных результатов испытания, требуется проведение валидационного исследования [12].

Для исключения ложноотрицательных результатов микробиологического исследования важно использовать растворитель, который не будет оказывать токсического действия на микроорганизмы, возможно, содержащиеся в ЛС. Для этого необходимо проводить испытание контрольной группы (положительный контроль) без ЛС с использованием микроорганизмов.

Важно учитывать и фактор разведения, так, например, для ЛС, обладающих антимикробным действием, возможно применение специфических растворителей, нейтрализующих антимикробное действие конкретного препарата и не являющихся токсичными, лишь в определенном разведении. Так, для субстанции N-метилглюкамин возможно снятие антимикробного действия в разведении 1:100 с использованием в качестве растворителя подкисленной пептонной воды. При использовании разведения 1:500, 1:1000 рост микроорганизмов

отсутствует, следовательно, применение большего объема растворителя оказывает бактерицидное и фунгицидное действие на микроорганизмы. При использовании щелочной пептонной воды в качестве растворителя субстанций L-яблочной и янтарной кислот в разведении 1:10 антимикробное действие нейтрализовывалось, а при больших разведениях 1:100, 1:500, 1:1000 рост микроорганизмов отсутствовал. Во всех трех случаях контроль культуры в присутствии специфического растворителя без препарата давал отрицательные результаты, что свидетельствует о токсичности растворителя без препарата для микроорганизмов. При контроле культуры с обычным растворителем (фосфатно-буферный раствор) все микроорганизмы давали положительный результат (табл. 4).

Важным фактором, влияющим на рост и развитие микроорганизмов, является pH. Оптимальные значения для большинства патогенных бактерий составляют 6–8, для дрожжевых и плесневых грибов — 5–6 [13]. Смещение pH в неоптимальный диапазон для развития тест-штамма приводит к ингибированию его роста, что и наблюдалось в данном исследовании. Поэтому целесообразно учитывать влияние растворителя на возможные микроорганизмы-контаминанты лекарственных средств и фактор разведения отобранной пробы в специфических растворителях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предотвращение ложной оценки качества ЛС является важнейшим аспектом получения достоверных результатов определения микробиологической чистоты. Система мероприятий по предотвращению возможности получения ложноположительных (контроль стерильности используемых питательных сред, реактивов, мониторинг помещений) и ложноотрицательных результатов исследования (контроль ростовых свойств и селективности питательных сред, выбор подходящих условий инкуба-

Таблица 4. Применение специфического инактиватора для нейтрализации антимикробного действия фармацевтических субстанций

Table 4. The use of a specific inactivator for neutralization of antimicrobial activity of pharmaceutical substances

Наименование НЛС	Растворитель	Тест-штаммы			
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
		Разведение, при котором снимается антимикробное действие			
N-метилглюкамин, субстанция	Подкисленная пептонная вода	1:100	1:100	1:100	1:100
L-яблочная кислота, субстанция	Щелочная пептонная вода	1:10	1:10	1:10	1:10
Янтарная кислота, субстанция	Щелочная пептонная вода	1:10	1:10	1:10	1:10
Контроль культуры с использованием в качестве растворителя щелочной пептонной воды		—	—	—	—
Контроль культуры с использованием в качестве растворителя подкисленной пептонной воды		—	—	—	—
Контроль культуры с использованием в качестве растворителя фосфатно-буферного раствора		+	+	+	+

Примечание. «—» обозначает отсутствие роста микроорганизмов, «+» — наличие роста микроорганизмов.

ции и методики посева, учет лекарственной формы препарата, обоснование используемого количества образца, растворителя и фактора разведения, учет антимикробного действия) в комплексе обеспечат объективную оценку качества микробиологической чистоты НЛС.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гунар ОВ, Сахно НГ, Новик ЕС, Булгакова ГМ, Колосова ЛВ, Буйлова ИА и др. Развитие микробиологических методов анализа лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(1):15–8. [Gunar OV, Sakhno NG, Novik ES, Bulgakova GM, Kolosova LV, Buylova IA, et al. Development of microbiological methods of drug analysis. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(1):15–8 (In Russ.)]
2. Гунар ОВ. Микрофлора лекарственных средств и различные аспекты ее изучения (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2011;(2):31–40. [Gunar OV. Microflora of medicines and various aspects of its study (review). *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharm Chem J*. 2011;(2):31–40 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2011-45-2-31-40>
3. Гунар ОВ. Риск получения ложных микробиологических результатов при контроле качества лекарственных средств. *Фармация*. 2005;(2):29–31. [Gunar OV. The risk for obtaining false microbiological results in the quality control of drugs. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2005;(2):29–31 (In Russ.)]
4. Гунар ОВ, Сахно НГ, Абрамович РА. *Основы валидации микробиологических методов фармацевтического анализа*. М.: РУДН; 2017. [Gunar OV, Sakhno NG, Abramovich RA. *Basics of validation of microbiological methods of pharmaceutical analysis*. Moscow: PFUR; 2017 (In Russ.)]
5. Гунар ОВ, Сахно НГ, Рощина МВ. Микробиологический мониторинг помещений лаборатории микробиологии. Анализ рисков. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(4):12–7. [Gunar OV, Sakhno NG, Roshchina MV. Microbiological monitoring of the premises of the microbiology laboratory. Risk analysis. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;(4):12–7 (In Russ.)]
6. Общая фармакопейная статья 1.2.4.0002.15 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. [General monograph 1.2.4.0002.15 Microbiological purity. The State pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)]
7. Гунар ОВ, Сахно НГ, Булгакова ГМ, Буйлова ИА. Особенности выделения некоторых видов бактерий из лекарственных средств. *Фармация*. 2015;(3):47–52. [Gunar OV, Sakhno NG, Bulgakova GM, Buylova IA. Specific characteristics of isolation of some bacterial species from medications. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2015;(3):47–52 (In Russ.)]
8. Niemelä S. *Uncertainty of Quantitative Determinations Derived by Cultivation of Microorganisms*. Helsinki: Centre for Metrology and Accreditation; 2002.
9. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017. Available from: <http://online.edqm.eu>
10. Гунар ОВ, Каграманова КА. Методы определения антимикробного действия лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2005;(5):53–6. [Gunar OV, Kagramanova KA. Methods for determining the antimicrobial activity of drugs. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharm Chem J*. 2005;(5):53–6 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2005-39-5-53-56>
11. Wunschel D, Fox KF, Black GE, Fox A. Discrimination among the *B. cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR. *Syst Appl Microbiol*. 1995;17(4):625–35. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80085-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80085-8)
12. Буйлова ИА. Разработка методического подхода к анализу микробиологической чистоты отдельных групп нестерильных лекарственных средств: дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2016. [Buylova IA. Development of a methodical approach to the determination of microbiological purity of non-sterile drugs: Cand. Pharm. Sci. [dissertation]. Moscow; 2016 (In Russ.)]
13. Галынкин ВА, Заикина НА, Кочеровец ВИ, Курбанова ИЗ. *Путательные среды*. Справочник. СПб: Проспект науки; 2006. [Galynkin VA, Zaikina NA, Kocherovets VI, Kurbanova IZ. *Culture media. Handbook*. St. Petersburg: Prospekt nauki; 2006 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ

Буйлова Ирина Александровна, канд. фарм. наук, эксперт 1-й категории лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0003-3787-269X>

Сахно Надежда Геннадьевна, канд. фарм. наук, ведущий эксперт лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0003-1773-7423>

Булгакова Галина Михайловна, ведущий эксперт лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0001-6474-4795>

Гунар Ольга Викторовна, д-р фарм. наук, начальник лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

AUTHORS

Irina A. Buylova, Cand. Sci. (Pharm.), 1st Professional Category Expert of the Microbiology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0003-3787-269X>

Nadezhda G. Sakhno, Cand. Sci. (Pharm.), Leading Expert of the Microbiology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0003-1773-7423>

Galina M. Bulgakova, Leading Expert of the Microbiology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0001-6474-4795>

Olga V. Gunar, Dr. Sci. (Pharm.), Head of the Microbiology Laboratory of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID**: <http://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

Статья поступила 13.02.2018
Принята к печати 22.08.2018

Article was received 13 February 2018
Accepted for publication 22 August 2018

Методологический подход к планированию эксперимента при выборе качественных реакций для подтверждения подлинности компонентов лекарственного средства (на примере аскорбиновой кислоты)

Ю. Б. Пурим, М. Л. Круглякова, Л. Н. Буланова, М. В. Агапкина, Л. А. Стронова,
Т. Н. Боковой*, Е. П. Герникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Необходимость подтверждения подлинности действующих или вспомогательных веществ многокомпонентных лекарственных средств, в том числе с использованием качественных реакций, влечет за собой необходимость проведения исследований по выбору реакций и условий их проведения с учетом мешающего влияния других компонентов лекарственного средства и количества используемого образца. **Цель работы:** разработка методологического подхода к планированию эксперимента при выборе качественных реакций для подтверждения подлинности определяемого компонента лекарственного средства на основании результатов исследований возможности использования известных качественных реакций (на примере аскорбиновой кислоты в многокомпонентном лекарственном средстве — 0,4 мг аскорбиновой кислоты / 100 мг содержимого флакона) с учетом мешающего влияния других компонентов лекарственного средства и количества используемого образца. **Материалы и методы:** в качестве объекта исследования было выбрано многокомпонентное лекарственное средство — лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения с лекарственным веществом, обладающим противовоспалительным действием, в состав которого входит аскорбиновая кислота в качестве стабилизатора (антиоксиданта). В результате анализа данных литературы выбраны качественные реакции для проведения исследований возможности их использования для подтверждения подлинности аскорбиновой кислоты в изучаемом лекарственном средстве. Проведена экспериментальная проверка реакций, основанных на кислотных и восстановительных свойствах аскорбиновой кислоты. **Результаты:** установлено, что в изучаемом многокомпонентном лекарственном средстве для подтверждения подлинности аскорбиновой кислоты могут быть применимы несколько известных качественных реакций: реакции образования аскорбината железа и восстановления нитрата серебра до металлического серебра после предварительного отделения аскорбиновой кислоты от других компонентов лекарственного средства, а также реакция образования берлинской лазури, йодная проба и реакция с раствором перманганата калия, не требующие дополнительной пробоподготовки. Использование реакций с раствором метиленового синего и реактивом Фелинга применительно к данному лекарственному средству нецелесообразно, так как результат указанных реакций слабо выражен. **Выводы:** на примере многокомпонентного лекарственного средства разработан методологический подход к выбору качественных реакций для подтверждения подлинности одного из компонентов лекарственного средства (например, аскорбиновой кислоты). Алгоритм действий включает в себя выбор реакций, определение их чувствительности и целесообразности применения для конкретного лекарственного средства, изучение влияния других его компонентов на результат химической реакции, а также необходимость или отсутствие дополнительной пробоподготовки. Совокупность проведенных исследований позволяет сделать выбор качественных реакций и оптимальных условий их проведения для достижения поставленной цели — подтверждения подлинности определяемого вещества.

Ключевые слова: методологический подход; качественные реакции; условия проведения испытания; аскорбиновая кислота; антиоксидант; парентеральные лекарственные средства

Для цитирования: Пурим ЮБ, Круглякова МЛ, Буланова ЛН, Агапкина МВ, Стронова ЛА, Боковой ТН, Герникова ЕП. Методологический подход к планированию эксперимента при выборе качественных реакций для подтверждения подлинности компонентов лекарственного средства (на примере аскорбиновой кислоты). *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):193–200. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-193-200>
***Контактное лицо:** Боковой Татьяна Николаевна; Bokovikova@expmed.ru

A Methodological Approach to Designing Experiments when Dealing with Identification Tests for Medicinal Product Components (as Illustrated by Ascorbic Acid)

Yu. B. Purim, M. L. Kruglyakova, L. N. Bulanova, M. V. Agapkina, L. A. Stronova,
T. N. Bokovikova*, E. P. Gernikova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

The need for identification testing of active substances or excipients in multi-component medicinal products, including the use of qualitative tests, calls for research substantiating the choice of tests and test conditions with due regard to interference effects caused by other components of medicinal products and the amount of the sample used. **The aim of the study** was to develop a me-

thodological approach to designing experiments while selecting qualitative reactions for identification testing of a medicinal product component based on the results of studies investigating the possibility of using known qualitative tests (as illustrated by ascorbic acid in a multi-component product — 0.4 mg of ascorbic acid per 100 mg of the vial contents) with due regard to interference on the part of other medicinal product components and the amount of the sample used. **Material and methods:** the study focused on a multi-component medicinal product — lyophilisate for solution for intravenous and intramuscular injections containing an anti-inflammatory active substance and ascorbic acid as a stabilizing agent (antioxidant). The analysis of literature sources helped to determine qualitative tests that were assessed for potential use for identification testing of ascorbic acid as a component of the analysed medicinal product. The study involved experimental testing of the qualitative reactions based on acidic and reducing properties of ascorbic acid. **Results:** it was demonstrated that several well-known qualitative tests could be used for identification testing of ascorbic acid as a component of the analysed medicinal product, namely, the reaction of ferrous ascorbate formation and the reaction of silver nitrate reduction to metallic silver after preliminary separation of ascorbic acid from the other medicinal product components, as well as the reaction of Prussian blue formation, iodine test and reaction with a potassium permanganate solution, which do not require additional sample preparation. It is not practicable to use the reaction with a methylene blue solution and the Fehling's reagent reaction for this particular medicinal product, since their results are feeble. **Conclusions:** the analysis of the multi-component medicinal product helped to develop a methodological approach to choosing qualitative reactions for identification testing of one of the medicinal product's components (e.g., ascorbic acid). The suggested algorithm includes the choice of reactions, determination of their sensitivity and applicability for a particular medicinal product, analysis of the other components' effects on the results of the chemical reaction, and the need for additional sample preparation. The whole complex of the studies performed helped to determine qualitative reactions and optimal conditions for identification testing of the analysed substance. **Key words:** methodological approach; qualitative reactions; test conditions; ascorbic acid; antioxidant; parenterals

For citation: Purim YuB, Bulanova LN, Agapkina MV, Stronova LA, Bokovikova TN, Gernikova EP. A methodological approach to designing experiments when dealing with identification tests for medicinal product components (as illustrated by ascorbic acid). *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(3):193–200. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-193-200>

*Corresponding author: Tatiana N. Bokovikova; Bokovikova@expmed.ru

Парентеральные лекарственные средства (ЛС) представляют собой твердые и жидкие стерильные лекарственные формы, стабильность которых достигается как строгим соблюдением асептических условий их приготовления, так и использованием стабилизаторов [1, 2] — веществ, позволяющих сохранять физико-химические свойства и фармакологическую активность, предусмотренные требованиями фармакопеи или нормативной документации (НД), в течение установленного срока годности.

Около 90 % лекарственных веществ, входящих в состав инъекционных ЛС, требуют применения стабилизаторов или особых условий приготовления, так как в результате химических реакций они могут претерпевать различные изменения: гидролиз, окисление-восстановление, полимеризацию, фотохимическую деструкцию и др.

Механизм действия стабилизаторов сводится как к улучшению растворимости лекарственных веществ (солюбилизации), созданию определенного значения рН среды, так и предупреждению окислительно-восстановительных процессов. При этом вещества, применяющиеся в качестве стабилизаторов, должны быть безопасными как в чистом виде, так и в составе лекарственного препарата и разрешены к применению в медицинской практике. Стабилизаторы должны выполнять функциональное назначение — обеспечивать устойчивость ЛС. Количество добавляемого стабилизатора указывается в НД [1, 2].

Лекарственные вещества, имеющие в своей молекуле спиртовые, фенольные, карбонильные радикалы и другие функциональные группы с подвижным атомом водорода, легко разлагаются, окисляясь под воздействием кислорода воздуха. С целью стабилизации ЛС используют антиоксиданты, окисляющиеся значительно легче подобных лекарственных веществ, тем самым предотвращая их

окисление. К числу антиоксидантов относится, например, аскорбиновая кислота [1].

При стабилизации ЛС, как правило, используется комплексный подход, осуществляемый путем введения различного типа стабилизаторов, например: нескольких прямых антиоксидантов; прямого и косвенного (комплексообразователя) антиоксидантов; антиоксиданта и вещества, обеспечивающего рН среды; антиоксиданта и консерванта (антимикробная стабилизация).

Таким образом, для стабилизации окисляющихся соединений необходимо создать оптимальные значения рН растворов, исключить влияние на лекарственное вещество кислорода и катализаторов в процессе приготовления, стерилизации и хранения лекарственного препарата.

Примером такого способа стабилизации ЛС является многокомпонентный препарат (лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения) с лекарственным веществом, обладающим противовоспалительным (обезболивающим, жаропонижающим) действием и вспомогательными веществами: маннитол, динария эдетат, аскорбиновая кислота, трометамол, натрия гидроксид / хлористоводородная кислота.

Для идентификации и количественного определения аскорбиновой кислоты (АСК) известны и широко используются различные химические, физические и физико-химические методы анализа, например: рамановская спектроскопия или другие спектральные методы анализа в инфракрасной и ультрафиолетовой области спектра [3, 4]. Для обнаружения аскорбиновой кислоты применимы разные виды хроматографии (хроматография в тонком слое сорбента, высокоэффективная жидкостная или газовая хромато-масс-спектрометрия). В литературе представлены результаты исследований по разработке методики пробоподготовки образцов, содержащих АСК;

показано влияние состава подвижных фаз на хроматографические характеристики АСК при использовании вышеуказанных методов анализа [3, 5–7].

Цель работы — разработка методологического подхода при планировании эксперимента для выбора реакций, подтверждающих подлинность определяемого компонента в изучаемом ЛС, основанного на результатах исследований возможности использования известных качественных реакций.

В основе качественного анализа АСК, как правило, лежат ее кислотные и восстановительные свойства. В результате реакций появляется или исчезает окрашивание, а также может образовываться осадок [8–11].

К реакциям кислотного характера относится реакция с солью двухвалентного железа с образованием темно-фиолетового окрашивания — аскорбината железа, которое исчезает при добавлении серной кислоты [12].

Указанная качественная реакция первоначально была проведена с водными растворами АСК разной концентрации. Светлое фиолетовое окрашивание было получено с 2 мл раствора, содержащего 1 мг/мл АСК, после прибавления к нему 0,1 г гидрокарбоната натрия и около 0,02 г железа (II) сульфата (при стоянии окрашивание бледнело). Выраженное фиолетовое окрашивание, исчезающее при добавлении серной кислоты разведенной 16 %, было получено только при увеличении концентрации раствора АСК в два раза.

При воспроизведении описанной реакции непосредственно с водным раствором ЛС, содержащим 1 мг/мл АСК (содержимое пяти флаконов растворяли в 2 мл воды), характерное фиолетовое окрашивание не образовывалось, а наблюдалось коричневое окрашивание (со временем выпадал осадок коричневого цвета), и после прибавления серной кислоты разведенной 16 % никаких изменений не происходило. Проведение реакции с испытуемым раствором большей концентрации было нецелесообразно.

Следующим этапом наших исследований было изучение возможности проведения данной реакции с раствором АСК после отделения других компонентов ЛС. Для этого содержимое пяти флаконов ЛС встряхивали в течение 3 мин с 2 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, после чего смесь центрифугировали в течение 3 мин при 3000 об/мин, надосадочную жидкость фильтровали через фильтр «синяя лента», к полученному фильтрату прибавляли 2 мл метилхлорида, встряхивали и снова центрифугировали. При проведении испытания с полученным экстрактом АСК наблюдалось темно-серое окрашивание. С увеличением концентрации АСК вдвое раствор окрашивался в темно-фиолетовый цвет, который исчезал после добавления 5 мл серной кислоты разведенной 16 %.

Для подтверждения подлинности АСК чаще используются окислительно-восстановительные реакции, чем реакции, основанные на ее кислотных свойствах. АСК легко окисляется в связи с наличием в молекуле ендольной группировки с подвижными атомами водорода. Окисление может проходить

в две стадии: с обратимым процессом окисления, при котором АСК окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты (кетонная форма), способной снова восстанавливаться до АСК, или более глубоким окислением (вторая стадия) с разложением дегидроаскорбиновой кислоты [12].

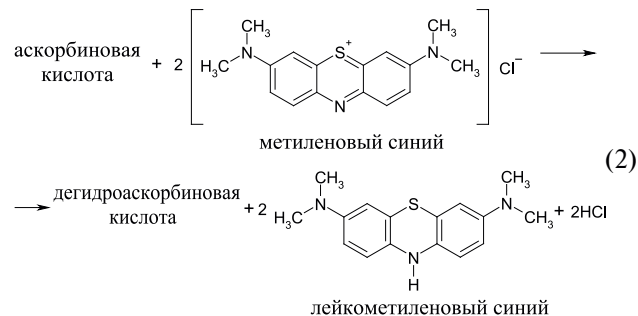


Окисление АСК легко происходит в нейтральной и щелочной среде, оно катализируется ионами тяжелых металлов (меди, железа, серебра), при этом соли окислов металлов восстанавливаются в соли закиси, а в щелочной среде, например, соли меди и серебра восстанавливаются до металлов. В кислой среде восстанавливающие свойства аскорбиновой кислоты выражены значительно слабее [12].

Изучена возможность подтверждения подлинности АСК по реакции с раствором нитрата серебра, в результате которой происходит восстановление ионов серебра до металлического серебра. При добавлении к пробе, содержащей 4 мг АСК, 0,5 мл серебра нитрата раствора 1 % (серебра нитрата раствор 2 % разбавляли водой вдвое) выпадал осадок темно-серого цвета.

С целью уменьшения влияния других компонентов препарата на результат указанной качественной реакции определение проводили с экстрактом АСК из раствора ЛС, после чего доводили pH среды до необходимой величины (около 8) аммиака раствором 10 % (1–2 капли). Раствор, содержащий 2 мг АСК, приобретал светло-серую окраску. При увеличении содержания АСК до 4 мг раствор становился темно-серого цвета, со временем выпадал осадок серого цвета (серебро).

Изучена возможность использования окислительно-восстановительной реакции с раствором метиленового синего для подтверждения подлинности АСК, в результате которой метиленовый синий восстанавливается и переходит в бесцветную лейкоформу [12].



В качестве испытуемого раствора использовали 2 мл экстракта АСК (1 мг/мл) с добавлением 1 капли метиленового синего спиртового раствора 0,05 % (метиленового синего спиртового раствора 0,1 % разбавляли вдвое спиртом 96 %). Испытуемый раствор после добавления индикатора имел голубой цвет.

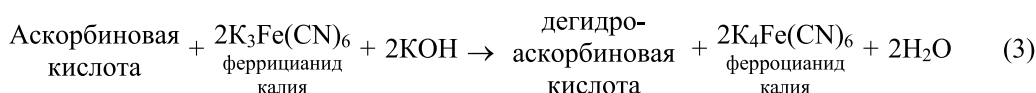
Для сравнительной оценки результата реакции определение проводили параллельно с раствором сравнения и контрольным раствором. Раствор сравнения — тот же объем испытуемого раствора (практически бесцветный раствор с едва заметным желтоватым оттенком); контрольный раствор (голубого цвета) — смесь 2 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и 1 капли метиленового синего спиртового раствора 0,05 %. Все растворы подвергали нагреванию на водяной бане при 40 °С в течение 3 мин, после чего цвет испытуемого раствора практически не изменялся. При проведении данной реакции в тех же условиях с 2 мл водного раствора АСК (1 мг/мл) раствор обесцвечивался. Дополнительно были проведены испытания с разбавленным в пять раз раствором метиленового синего, но и в этих условиях испытуемый раствор не обесцвечивался (имел голубой оттенок).

Другая качественная реакция на АСК с реактивом Фелинга основана на восстановлении окисной меди (CuO) до закисной меди красного цвета (Cu₂O).

При проведении реакции с 4 мл реактива Фелинга и 2 мл водного раствора ЛС, содержащего 1 мг/мл АСК, испытуемый раствор приобретал вид студенистой массы бирюзового цвета с желтоватыми разводами (при длительном отстаивании наблюдали образование незначительного количества

осадка оранжевого цвета). Выделение АСК из раствора ЛС существенно не повлияло на результат реакции. Проведение испытания с 2 мл водного раствора АСК (1 мг/мл) показало, что содержание АСК в реакционной смеси недостаточно (раствор мутнел, приобретая буровато-зеленый цвет). При увеличении содержания АСК в два раза раствор становился желтовато-зеленого цвета, и лишь со временем выпадал оранжевый осадок, то есть для получения характерного результата описанной реакции необходимо использовать растворы АСК большей концентрации. В рамках наших исследований это нецелесообразно, так как требует использования большого количества ЛС с учетом малого содержания в нем АСК.

Для подтверждения подлинности АСК также была использована реакция образования берлинской лазури (уравнения (3) и (4)), в результате которой в щелочной среде происходит восстановление феррицианида калия (железосинеродистого калия) до ферроцианида калия (железистосинеродистого калия), который при взаимодействии с хлорным железом (III) в кислой среде образует плохо растворимую в воде соль трехвалентного железа (раствор окрашивается в синий цвет, затем выпадает темно-синий осадок, цвет которого при осторожном насливании воды становится более отчетливым) [12].



Реакцию проводили как непосредственно с раствором ЛС, так и с экстрактом АСК. Содержимое одного флакона растворяли в 10 мл воды. К 2 мл полученного раствора прибавляли 0,1 мл калия гидроксида раствора 10 %, 0,2 мл калия феррицианида раствора 5 % и энергично встряхивали; после чего добавляли 1 мл хлористоводородной кислоты раствора 10 % и 0,1 мл железа (III) хлорида раствора 1 %. Мгновенно образовывалось интенсивное синее окрашивание. При взбалтывании раствор приобретал сине-зеленое окрашивание (цвет морской волны); со временем выпадал осадок темно-синего цвета (берлинская лазурь) и осадок желтого цвета (действующее вещество). При проведении реакции с 2 мл экстракта АСК (1 мг/мл) образовывалось характерное сине-зеленое окрашивание и выпадал темно-синий осадок, цвет которого при осторожном насливании воды становился более отчетливым.

Йодная проба на АСК и реакция с раствором перманганата калия, при которых должно происходить обесцвечивание прибавляемых по каплям реактивов, были проведены с раствором ЛС (содержимое 1 флакона растворяли в 2 мл воды) и с 2 мл экстракта АСК (1 мг/мл).

После прибавления одной капли йода раствора 0,05 М или трех капель калия перманганата раствора 3 % к раствору ЛС окраска от прибавляемых реактивов обесцвечивалась, при этом окраска самого испытуемого раствора (желтоватого цвета) первоначально не изменялась (при дальнейшем прибавлении указанных реактивов испытуемый раствор приобретал оранжевый, а затем коричневатый оттенок). При проведении реакций с экстрактом АСК pH раствора доводили до величины 7–8 прибавлением калия гидроксида раствора 0,5 % (калия гидроксида раствор 10 % разбавляли водой в 20 раз). Прибавляемые по каплям растворы йода и перманганата калия обесцвечивались (испытуемый раствор оставался практически бесцветным).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований на примере АСК предложен методологический подход к выбору качественных реакций для идентификации одного из компонентов ЛС. Алгоритм исследований включает в себя определение перечня возможных химических реакций и установление их чувствительности, определение влияния других компонентов ЛС на получение ожидаемого

результата реакции, а также разработку конкретных условий выбранных реакций для данного ЛС, учитывая, в случае необходимости, проведение дополнительной пробоподготовки. Установлено, что в изучаемом многокомпонентном ЛС для подтверждения подлинности АСК могут быть применимы несколько известных качественных реакций на АСК: реакции образования аскорбината железа и восстановления нитрата серебра до металлического серебра (после предварительной экстракции АСК из раствора ЛС), а также реакция образования берлинской лазури, йодная проба и реакция с раствором перманганата калия, не требующие дополнительной пробоподготовки (отделения АСК от других компонентов ЛС). Использование реакций с раствором метиленового синего и реактивом Фелинга, применительно к данному ЛС, нецелесообразно, так как результат указанных реакций слабо выражен, что отчасти можно объяснить малой концентрацией АСК в испытуемых растворах или мешающим влиянием других компонентов ЛС. В случае включения в нормативную документацию качественных реакций для подтверждения подлинности определяемого компонента ЛС методики должны быть валидированы в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII изд.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Parenteral medicinal products are solid and liquid sterile dosage forms whose stability is ensured by scrupulous observance of aseptic preparation conditions and the use of stabilizing agents [1, 2] — substances that help preserve physico-chemical properties and pharmacological activity required by the pharmacopoeial monograph or manufacturer's specification during the established shelf-life.

About 90 % of pharmaceutical substances that are found in injectable dosage forms require the use of stabilizing agents or special preparation conditions since chemical reactions may produce various changes in them: hydrolysis, oxidation-reduction, polymerisation, photochemical degradation, etc.

The mechanism of action of stabilizing agents consists in the improvement of the active substance solubility (solubilisation), maintenance of a particular pH value and prevention of oxidation-reduction processes. In addition, substances used as stabilizers have to be safe both when unformulated and when a part of a medicinal product, and be authorised for medical use. Stabilizing agents have a functional role to play — they ensure the stability of a medicinal product. The required amount of the stabilizing agent is indicated in the product specification [1, 2].

Active substances whose molecule includes alcohol, phenolic, carbonyl chemical groups and other functional

groups with a labile hydrogen atom, easily degrade as a result of air oxidation. In order to ensure stability of such medicinal products one may use antioxidants that are oxidized much easier than these active substances and, therefore, prevent their oxidation. One such antioxidant is ascorbic acid [1].

Stability of a medicinal product can usually be achieved by using a complex approach involving the use of different types of stabilizing agents, e.g. several direct antioxidants; a direct and an indirect (complexing agent) antioxidants; an antioxidant and an agent ensuring the required pH; an antioxidant and a preservative agent (antimicrobial stabilization).

Thus, the stability of oxidizable compounds can be achieved by ensuring optimal pH values of solutions, and ruling out the effects of oxygen and catalysts during preparation, sterilization and storage of medicinal products.

This method of achieving stability may be illustrated by a multi-component medicinal product (lyophilisate for solution for intravenous and intramuscular injections) containing an anti-inflammatory (anaesthetic, antipyretic) active substance and excipients — mannitol, disodium edentate, ascorbic acid, trometamol, sodium hydroxide/hydrochloric acid.

Ascorbic acid (AsA) identification and assay can be carried out using such widely used chemical, physical and physico-chemical methods as Raman spectrometry or other IR and UV spectroscopic methods [3, 4]. Ascorbic acid can be detected by various types of chromatography (thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography or gas chromatography-mass spectrometry). Literature sources report results of studies devoted to sample preparation techniques for AsA-containing products, they also illustrate the effect of mobile phase composition on AsA chromatographic characteristics when using the analytical methods mentioned above [3, 5–7].

The aim of the study was to develop a methodological approach to designing experiments while selecting qualitative reactions for identification testing of a medicinal product component based on the results of studies investigating the possibility of using known qualitative tests.

Qualitative analysis of AsA is usually based on its acidic and reducing properties. Chemical reactions produce a colour change and may also lead to precipitation [8–11].

Acidic reactions include the reaction with ferrous salt, which results in dark purple coloration, caused by ferrous ascorbate, which disappears upon addition of sulfuric acid [12].

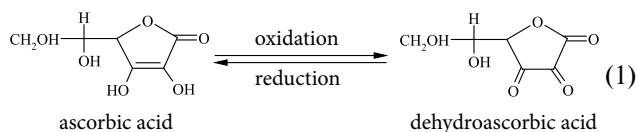
This qualitative reaction was first carried out with AsA aqueous solutions of different concentrations. Light purple colour was obtained with 2 ml of 1 mg/ml AsA solution after addition of 0.1 g of sodium hydrocarbonate and approximately 0.02 g of iron (II) sulfate (when left to stand the colour turned pale). The intense purple colour that disappeared upon addition of sulfuric acid solution 16 % was achieved only after doubling the AsA solution concentration.

When this reaction was reproduced with the drug aqueous solution containing 1 mg/ml AsA (the contents of five vials were diluted in 2 ml of water), the character-

istic purple colour was not observed, instead the solution turned brown (and after some time a brown precipitate was formed), and the addition of sulfuric acid solution 16 % did not produce any changes. It was considered impractical to carry out the reaction with the test solution of higher concentration.

At the next stage we studied the possibility of carrying out this reaction with an AsA solution after removing all other components of the medicinal product. For that purpose the contents of five vials were shaken for 3 minutes together with 2 ml of 0.1 M hydrochloric acid solution, after that the mixture was centrifuged for 3 minutes at 3000 rpm, the supernatant was filtrated through "blue ribbon" filter, and 2 ml of methylene chloride were added to the obtained filtrate, then the mixture was shaken and centrifuged once again. The reaction with the obtained AsA extract produced dark grey colour. When the AsA concentration was doubled, the solution turned dark purple, and this colour disappeared upon addition of 5 ml of sulfuric acid solution 16 %.

Oxidation-reduction reactions are more often used for AsA identification testing than acidic reactions. AsA is readily oxidized due to the presence of the enediol group with labile hydrogen atoms in its molecule. There may be two stages of oxidation: when AsA undergoes reversible oxidation to dehydroascorbic acid (ketonic form) which can be restored to AsA, or more severe oxidation (second stage) with decomposition of dehydroascorbic acid [12].



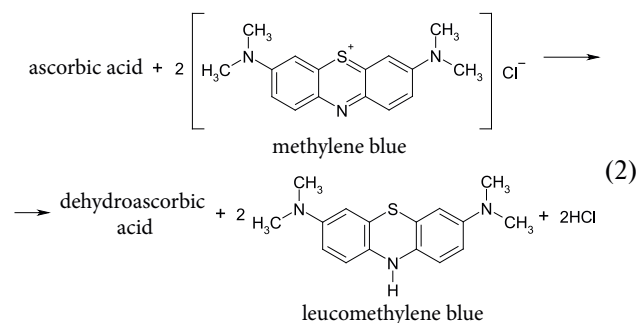
AsA is easily oxidized at neutral and alkaline pH, oxidation is catalyzed by heavy metal ions (copper, iron, silver), in which case metal oxide salts are reduced to protoxide salts, and at alkaline pH, for instance, copper salts and silver salts are reduced to metals. The reducing properties of ascorbic acid are much less prominent at acidic pH [12].

The present study investigated the possibility of AsA identification testing by using the reaction with silver nitrate solution, which results in the reduction of silver ions to silver metal. When 0.5 ml of silver nitrate solution 1 % (silver nitrate solution 2 % diluted with water to half the concentration) was added to the sample containing 4 mg of AsA, a dark grey precipitate was formed.

In order to minimize the effect of the other medicinal product components on the result of the above-mentioned test, the reaction was carried out using an AsA extract obtained from the medicinal product solution whose pH value was adjusted as required (to about 8) by ammonia solution 10 % (1–2 drops). The solution containing 2 mg of AsA turned light grey. When the AsA concentration was increased to 4 mg, the solution turned dark grey, and after some time a grey precipitate was formed (silver).

The study investigated the practicability of AsA identification testing by using the oxidation-reduction reaction with a methylene blue solution, which results in the

reduction of methylene blue to colourless leucomethylene blue [12].



The test solution was prepared by adding 1 drop of methylene blue alcohol solution 0.05 % (methylene blue alcohol solution 0.1 % was diluted to half the concentration by alcohol 96 %) to 2 ml of the AsA extract (1 mg/ml). The test solution turned blue after the addition of the indicator.

In order to perform comparative assessment of the reaction outcomes, parallel tests were carried out with the blank solution and the reference solution. The blank solution was represented by the same volume of the test solution (practically colourless solution with a very slight yellowish tint); and the reference solution (blue solution) was a mixture of 2 ml of 0.1 M hydrochloric acid solution and 1 drop of methylene blue alcohol solution 0.05 %. All the solutions were heated in the water bath at 40°C for 3 minutes, and the colour of the test solution did not show any changes. When the same reaction was performed for 2 ml of the AsA aqueous solution (1 mg/ml), the solution was discoloured. Additional tests were carried out using a methylene blue solution diluted to one fifth of its concentration, but even after that the test solution did not lose its colour (it still had a blue tint).

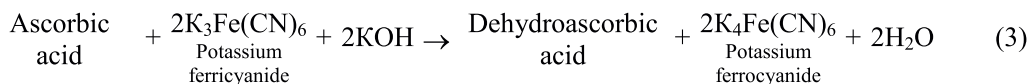
Another AsA identification test using Fehling's reagent is based on cupric copper (CuO) reduction to red cuprous copper (Cu₂O).

As a result of reaction with 4 ml of Fehling's reagent and 2 ml of drug aqueous solution containing 1 mg/ml of AsA, the test solution turned into a jelly-like turquoise substance with yellowish stains (when it was left to stand for a long time a small amount of orange precipitate was observed). The removal of AsA from the medicinal product solution did not have any significant impact on the result of the reaction. The reaction with 2 ml of the AsA aqueous solution (1 mg/ml) demonstrated that the AsA content in the reaction mixture was insufficient (the solution grew turbid and acquired a brownish-green colour). When the amount of AsA was doubled, the solution turned yellowish-green, and only after some time an orange precipitate was formed, which means that solutions with higher AsA concentrations should be used in order to obtain a representative result of the reaction in question. This is not practical for this study, since it requires the use of a large amount of the medicinal product, which contains a rather small amount of AsA.

AsA identification testing was also performed using the reaction of Prussian blue formation (formulas (3) and (4)), which leads to the reduction of potassium

ferricyanide at alkaline pH to potassium ferrocyanide which upon interaction with iron (III) chloride at acidic pH forms a ferric salt poorly soluble in water (the solu-

tion acquires blue colour and forms a dark blue precipitate whose colour becomes more intense upon accurate overlaying with water) [12].



The reaction was carried out using both the medicinal product solution and the AsA extract. The contents of one vial were diluted in 10 ml of water. Two ml of the obtained solution were mixed with 0.1 ml of potassium hydroxide solution 10 % and 0.2 ml of potassium ferricyanide solution 5 % and shaken vigorously; after that 1 ml of hydrochloric acid solution 10 % and 0.1 ml of iron (III) chloride solution 1 % were added. An intense blue colour was instantly observed. Upon stirring the solution it acquired a blue-green (sea-green) colour; after some time a dark blue precipitate (Prussian blue) and a yellow precipitate (active substance) were observed. When the reaction was carried out using 2 ml of the AsA extract (1 mg/ml), a characteristic green-blue colour and dark blue precipitate were observed; the colour of the precipitate became more intense upon accurate overlaying with water.

The iodine test and the reaction with a potassium permanganate solution, that should result in discoloration of reagents added by drops, were carried out using the medicinal product solution (contents of 1 vial diluted in 2 ml of water) and with 2 ml of the AsA extract (1 mg/ml).

Upon addition of one drop of 0.05 M iodine solution or three drops of potassium permanganate solution 3 % to the medicinal product solution, the reagents being added lost their colour, and the (yellowish) colour of the test solution did not change (upon further addition of the reagents the test solution turned orange and then brownish). When carrying out this reaction with the AsA extract, pH of the solution was adjusted to 7–8 by adding potassium hydroxide solution 0.5 % (potassium hydroxide solution 10 % diluted 20 times with water). The solutions of iodine and potassium permanganate added by drops were discolored (the test solution remained practically colourless).

CONCLUSION

The present study used AsA to illustrate the development of a methodological approach to the selection of qualitative reactions for identification testing of a medicinal product component. The suggested algorithm includes the choice of potential chemical reactions, determination of their sensitivity, analysis of the other components' effects on the expected results of the chemical reaction, and planning of specific conditions for the reactions chosen for a particular medicinal product, including, where necessary, additional sample preparation. It was demonstrated that several well-known qualitative tests could be used for identification testing of AsA as a component of the analysed medicinal product, namely,

the reaction of ferrous ascorbate formation and the reactions of silver nitrate reduction to metallic silver (after preliminary extraction of AsA from the medicinal product solution), as well as the reaction of Prussian blue formation, iodine test and reaction with a potassium permanganate solution, which do not require additional sample preparation (i.e. separation of AsA from the other medicinal product components). It is not practicable to use the reaction with a methylene blue solution and the Fehling's reagent reaction for this particular medicinal product, since their results are feeble, which can be accounted for by low AsA concentration in the test solutions and interference on the part of the other medicinal product components. In case manufacturers include qualitative reactions aimed at identification testing of medicinal product components into their product specifications, all the test methods have to be validated according to monograph OFS.1.1.0012.15 of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th edition.

Acknowledgements. The study reported in this publication was supported by the FSBI "SCEEMP" of the Ministry of Health of Russia and was carried out as part of a publicly funded research project (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590049-0).

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1–3. М.; 2015. [The State pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1–3. Moscow; 2015 (In Russ.)]
2. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА, Киселевский МВ, Лысикова СЛ, Бондарев ВП и др. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора. Оценка качества. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(1):4–14. [Avdeeva Zhl, Soldatov AA, Alpatova NA, Kiselevsky MV, Lysikova SL, Bondarev VP, et al. Recombinant granulocyte colony stimulating factor biosimilars. Quality assessment. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(1):4–14 (In Russ.)]
3. Hima V, Rubesh Kumar S, Duganath N, Devanna N. Quantization of ascorbic acid in ayurvedic amla capsule by various analytical techniques. *Der Pharma Chemica*. 2013;5(3):8–17.
4. Neuberger S, Jooß K, Flottmann D, Scriba G, Neusüß C. Raman spectroscopy and capillary zone electrophoresis for the analysis of degradation processes in commercial effervescent tablets containing acetylsalicylic acid and ascorbic acid. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;134:122–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.020>
5. Shanawany AE, Neugebauer M, El-Sadek M, Rucker G. HPLC method for quantitative determination of ascorbic acid, phenylephrine, paracetamol and caffeine mixture. *Indian J Pharm Sci*. 1990;52(4):182–5.

6. Goodpaster JV, Keto RO. Identification of ascorbic acid and its degradation products in black powder substitutes. *J Forensic Sci.* 2004;49(3):523–8.
7. Sadamasu Y, Morikawa M, Sakamaki N, Monma K, Kobayashi C. Quantitative analysis of L-ascorbic acid and erythorbic acid in foods by HPLC, and confirmation method by LC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 2018;59(1):11–7 (In Jap.). <https://doi.org/10.3358/shokueishi.59.11>
8. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. Часть 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения; 2007. [The State pharmacopoeia of the Russian Federation. 12th ed. Part 1. Moscow: Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products; 2007 (In Russ.)]
9. European Pharmacopoeia online. European Directorate for the Quality of Medicines. Available from: <http://online.edqm.eu>
10. United States Pharmacopeia. 39th ed. 2016. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf>
11. Погодина ЛИ. Анализ многокомпонентных лекарственных форм. Минск: Вышэйшая школа; 1985. [Pogodina LI. *Analysis of multicomponent dosage forms*. Minsk: Vysheyschaya shkola; 1985 (In Russ.)]
12. Файгель Ф. Капельный анализ органических веществ. М.: Госхимиздат; 1962. [Feigl F. *Spot tests in organic analysis*. Moscow: Goskhimizdat; 1962 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ

Пурим Юлия Борисовна, канд. фарм. наук, ведущий эксперт лаборатории химиико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6295-6292>

Круглякова Марина Леонидовна, эксперт 2-й категории лаборатории химиико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7601-6031>

Буланова Людмила Николаевна, эксперт 1-й категории лаборатории химиико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9923-7355>

Агапкина Маргарита Васильевна, эксперт 1-й категории лаборатории химиико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Стронова Лариса Александровна, канд. фарм. наук, главный эксперт лаборатории химиико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5598-5132>

Боковикова Татьяна Николаевна, д-р фарм. наук, начальник лаборатории химиико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1560-3424>

Герникова Евгения Петровна, канд. фарм. наук, главный эксперт лаборатории химиико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-0942-7049>

Статья поступила 09.01.2018
Принята к печати 22.08.2018

AUTHORS

Yulia B. Purim, Cand. Sci. (Pharm.), Leading Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6295-6292>

Marina L. Kruglyakova, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7601-6031>

Lyudmila N. Bulanova, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9923-7355>

Margarita V. Agapkina, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia

Larisa A. Stronova, Cand. Sci. (Pharm.), Chief Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5598-5132>

Tatiana N. Bokovikova, Dr. Sci. (Pharm.), Head of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1560-3424>

Evgenia P. Gernikova, Cand. Sci. (Pharm.), Chief Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-0942-7049>

Article was received 9 January 2018
Accepted for publication 22 August 2018



**Подписку на журнал можно оформить
в любом отделении «Почты России».**

Подписной индекс издания:

в каталоге Агентства «Роспечать»

**«Издания органов научно-технической
информации» — 57942**

С любого номера

в региональных агентствах подписки:

Урал-Пресс (www.ural-press.ru) — 57942

По объединенному каталогу

«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — Ф57942

