

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Каргин Владимир Сергеевич

**Разработка состава и технологии получения лекарственного
ранозаживляющего средства пролонгированного действия на основе
биоразлагаемых полимеров**

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,
профессор, член-корреспондент РАН
Пятигорская Наталья Валерьевна

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Обзор биоразлагаемых полимеров	13
1.1.1. Классификация биоразлагаемых полимеров	13
1.1.2. Биологические свойства и активность хитозана	17
1.1.3. Физико-химические свойства различных структур полимеров хитозана	18
1.1.4. Хитозан в качестве носителя фармацевтических субстанций	22
1.2. Анализ основных представителей лекарственных средств энзиматической природы	24
1.3. Лекарственные формы и основные способы применения лекарственных средств на основе хитозана в дерматологической практике	28
1.4. Биофармацевтические и технологические аспекты, влияющие на качество и эффективность лекарственного средства	31
1.5. Применение многофакторного анализа для разработки лекарственных средств	33
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1. Объекты исследования	37
2.1.1. Действующие вещества	37
2.1.2. Вспомогательные вещества	38
2.2. Реактивы, использованные в процессе разработки и анализа лекарственного средства	40
2.3. Планирование разработки лекарственного средства	41
2.4. Экспериментальные методы исследования разрабатываемых составов лекарственного средства	44
2.5. Математические методы исследования для осуществления выбора оптимального состава лекарственного средства	48
2.5.1. Корреляционный анализ	48
2.5.2. Метод построения диаграммы Исикавы	49
2.5.3. Метод дисперсионного анализа	50
2.5.4. Метод многофакторного анализа на основе функции желательности Харрингтона	51

2.5.5. Метод многофакторного анализа на основе пространства проектных параметров.....	51
ГЛАВА 3. ФАРМАЦЕВТИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА.....	53
3.1. Обоснование выбора лекарственной формы на основе параметров фармацевтической композиции.....	53
3.1.1. Определение состава действующих веществ лекарственного средства	53
3.1.2. Определение количественного состава действующих веществ лекарственного средства.....	54
3.2. Выбор вспомогательного вещества в качестве носителя лекарственной формы и его получение.....	54
3.2.1. Определение верхнего предела кислотности среды для растворения носителя	55
3.2.2. Исследование влияния амилолитического фермента на гидролиз структуры аскорбата хитозана.....	59
3.2.3. Выбор лекарственной формы лекарственного средства.....	60
3.2.4. Разработка способа получения твердой формы аскорбата хитозана.....	60
3.2.5. Фракционный анализ измельченного аскорбата хитозана	62
3.2.6. Насыпная плотность порошка твердой формы аскорбата хитозана.....	65
3.3. Изучение физико-химических и технологических характеристик составов лекарственных средств	65
3.3.1. Разработка и получение составов лекарственных средств	65
3.3.2. Изучение насыпного объема составов лекарственного средства.....	68
3.3.3. Изучение сыпучести составов лекарственного средства.....	69
3.3.4. Изучение поверхностной электризуемости составов лекарственных средств	72
3.3.5. Изучение высвобождения протеолитического фермента из составов лекарственных средств.....	75
3.3.6. Изучение высвобождения амилолитического фермента из составов лекарственных средств.....	84
3.4. Выбор оптимального состава лекарственного средства с помощью математического моделирования на основе многофакторного анализа	90
3.4.1. Выявление и оценка взаимосвязи между факторами.....	91

3.4.2. Уменьшение влияния факторов одной направленности на результаты выбора состава лекарственного средства	94
3.4.3. Оценка степени влияния нескольких факторов на качество разрабатываемого лекарственного средства	96
3.4.4. Выбор оптимального состава при помощи метода факторного анализа	98
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «ПОРОШОК БИОРАЗЛАГАЕМЫЙ ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ»	105
4.1. Исследования микробиологической чистоты лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»	105
4.2. Разработка и описание технологической схемы производства лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»	109
4.3. Исследование влияния условий и сроков хранения лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»	119
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «ПОРОШОК БИОРАЗЛАГАЕМЫЙ ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ»	142
5.1. Разработка и валидация аналитических методик определения показателей качества	142
5.1.1. Методика оценки протеолитической активности лекарственного средства	142
5.1.2. Методика оценки амилолитической активности лекарственного средства	156
5.1.3. Методика качественного определения аскорбиновой кислоты	168
5.1.4. Методика качественного определения хитозана	170
5.2. Разработка проекта спецификации лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»	172
5.3. Факторы, влияющие на перенос разработанных технологий и аналитических методик	174
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	179
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	181
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	182
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Результаты исследования высвобождения протеолитического фермента из протокола анализа теста растворимости	199
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Результаты исследования высвобождения амилолитического фермента из протокола анализа теста растворимости	208

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Акты внедрения	217
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Титульный лист опытно-промышленного регламента	220

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

К основным задачам развития медицинских наук, решение которых требует принципиально новых подходов для получения ожидаемых прорывных результатов, в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы), утвержденной распоряжением Правительства РФ (№ 3684-р от 31.12.2020) относятся, в том числе, получение новых данных о возможности использования природных (натуральных), синтетических и гибридных структур, разработка фармакологических подходов стимуляции функций регенерации тканей, разработка оригинальных по структуре и механизму действия лекарственных средств.

В настоящее время во всем мире отмечается возрастание интереса специалистов к препаратам на основе хитина (в основном получаемого путем переработки ракообразных), его производным и возможностям их использования в различных областях медицины и биотехнологии. Это связано с биологическими свойствами данного полимера, которые позволяют его отнести к группе веществ, обладающих выраженной фармакологической активностью. Производные хитина биосовместимы и биоразрушаемы до низкомолекулярных соединений (N-ацетилглюкозамин или глюкозамин).

В последнее десятилетие значительно расширились области применения хитозана. Хитин и хитозан по своему строению очень близки к целлюлозе, они так же обладают пленко- и волокнообразующими свойствами. Особое место данные полимеры занимают в медицине благодаря своим свойствам: низкая токсичность, биосовместимость с человеческими тканями, биodeградируемость и ускорение процессов заживления ран путем грануляции ткани в ответ на воспалительные процессы. Они способны стимулировать пролиферацию фибробластов, ангиогенез, синтез и нарастание коллагеновых волокон. Хитозан обладает антисептической активностью по отношению к наиболее часто встречающимся возбудителям гнойных осложнений. По силе действия он уступает антибиотикам, но при контакте с микробной флорой в жидкой среде сохраняет свою бактериостатическую активность в течение 2-2,5 суток. Особенно хитозан активен в кислой среде, характерной для начальных этапов любого раневого процесса.

Известны исследования растворимых и нерастворимых структур хитозана, которые обладают различными физико-химическими свойствами и применяются в разработке таких лекарственных форм, как растворы, гели, пленки, которые влияли на процесс заживления кожной раны у крыс и кроликов, и показали, что их применение обеспечивает достоверное

ускорение процессов репарации кожи. Все это подтверждает необходимость продолжения фундаментальных и прикладных исследований, направленных на изучение возможностей применения хитозана в медицинских целях.

Анализ процессов разработки и их понимание, оперативный контроль и управление процессом с помощью методов многофакторного анализа осуществляются в некоторых отраслях промышленности уже в течение нескольких десятилетий. Они являются неотъемлемой частью эмпирического и гибридного моделирования. В фармацевтической промышленности многофакторный анализ используется для связывания качества лекарственного средства (ЛС) со свойствами сырья и технологическим процессом, а также для его управления, масштабирования и трансфера.

Понимание многофакторной сущности качества имеет очень большое значение. Качество продукта определяется одновременно правильными значениями всех измеренных свойств, т.е. это признак, характеризующийся многими переменными. ЛС является результатом многофакторного совмещения свойств сырья и условий процесса, которые включают производство фармацевтической субстанции (ФС) и производство лекарственной формы (ЛФ). Эти процессы сказываются не только на одном или нескольких показателях качества готового продукта, но также и на его стабильности.

Направлением исследований была разработка ЛС на основе хитозана и ферментов, с использованием многофакторных методов планирования и математического анализа, которое должно обладать ранозаживляющим действием за счет ферментативных веществ. Применение разрабатываемого ЛС возможно при терапии длительно не заживающих ран, как в острой, так и хронической фазе, а также при гнойно-воспалительном процессе.

Степень разработанности темы исследования

Интерес к хитозансодержащим продуктам за счет их уникальных физико-химических и биологических свойств проявляют фармацевтическая, медицинская, химическая, биотехнологическая и пищевая промышленности. Несмотря на многочисленные исследования хитозана и его производных, и имеющиеся внедрения в практику, проблема создания лекарственной формы, содержащей производное хитозана, выступающего в качестве носителя лекарственного средства, оказывающего продолжительный антибактериальный эффект, является актуальной задачей и предметом многочисленных работ (И.И. Краснюка, С.А. Кедика, Н.Б. Дёминой, А.И.Сливкина, Р.А. Абрамович, Е.О. Медушевой, А.А. Белова и др.). Подтверждается также значительный уровень изобретательской активности в области технологии получения соединений, их производных, а также фармацевтических композиций и

технологии получения ЛС на основе хитозана. В связи с этим, разработка составов ЛС на основе хитозана является актуальным направлением.

В Центре фармацевтических технологий Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) был разработан, теоретически и экспериментально обоснован рациональный состав и оптимальная технология получения ЛС пролонгированного действия на основе биоразлагаемого полимера хитозана.

Цель и задачи исследования

Целью исследования является научно-обоснованная разработка состава и технологии получения лекарственного ранозаживляющего средства пролонгированного действия на основе хитозана и ферментов для лечения длительно не заживающих ран.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Провести анализ исследований в области разработок лекарственных средств на основе биоразлагаемых полимеров
2. Научно обосновать выбор лекарственной формы, определить основные факторы, влияющие на ее фармацевтическую разработку.
3. Используя многофакторный анализ, научно обосновать состав лекарственного средства для наружного применения.
4. Разработать технологию получения лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения».
5. Разработать методики контроля качества и провести их валидацию, разработать проект спецификации для лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

Научная новизна

Впервые использованы методы многофакторного анализа для ускорения процесса разработки оптимального состава ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

Методом многофакторного планирования эксперимента на основе функции желательности Харрингтона и других методов анализа теоретически обосновано и экспериментально доказано влияние изменения физико-химических и биофармацевтических показателей на качество ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» в зависимости от молекулярной массы полимера хитозана, что позволило выбрать оптимальный состав для создания лекарственной формы.

Теоретическая и практическая значимость исследований

На основании физико-химических и биофармацевтических исследований разработана стабильная в процессе хранения лекарственная форма – порошок для местного применения на основе хитозана и ферментов.

Проведена апробация технологии получения и методик контроля качества лекарственного средства на ООО «Тульская фармацевтическая фабрика». Результаты исследований вошли в комплексный отчет о проделанной работе в рамках конкурса «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (УМНИК) при поддержке Фонда содействия инновациям.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили работы зарубежных и российских ученых в области фармацевтической технологии, в частности, в вопросах фармацевтической разработки лекарственных средств.

Для оценки взаимосвязи между технологическими и биофармацевтическими факторами при выполнении экспериментов были использованы математические методы исследования, такие как корреляционный анализ, метод построения диаграммы Исикавы, метод дисперсионного анализа и метод многофакторного анализа на основе функции желательности Харрингтона для осуществления выбора оптимального состава ЛС.

В диссертационной работе использованы фармакопейные методы, включенные в Государственную Фармакопею РФ и Фармакопею ЕАЭС, Решение Коллегии ЕЭК от 10.05.2018 № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций», Решение Коллегии ЕЭК от 17.07.2018 № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств», Рекомендация Коллегии ЕЭК от 29.01.2019 № 3 «О Руководстве по производству готовых лекарственных форм лекарственных препаратов».

Основные положения, выносимые на защиту

- оптимальный состав носителя на основе хитозана для получения лекарственной формы;
- результаты изучения физико-химических, биофармацевтических и технологических свойств состава ЛФ;

- результаты выбора оптимального состава лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»;
- технология получения лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»;
- результаты по разработке методик контроля качества лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»;
- результаты изучения стабильности лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов обусловлена необходимым объемом экспериментального материала, однородностью выборки объектов эксперимента, применением современных методов исследования, сертифицированного оборудования, валидацией разработанных методик, применением методов математической статистики, теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных. При проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование, методами статистической обработки установлена воспроизводимость и правильность результатов исследований, что позволяет считать их достоверными.

Основные положения работы и результаты диссертационного исследования доложены на следующих конференциях: II Международная Научно-практическая конференция (14.11.2019 г. Москва); Межвузовский научный конгресс (24.01.2020 г., Москва); Международная научно-практическая конференция «Актуальные аспекты химической технологии биологически-активных веществ» (26.05.2020 г., Москва), XI всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (23.04.2021 г., Санкт-Петербург).

Апробация результатов диссертации состоялась на межкафедральной конференции кафедры промышленной фармации и кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования, кафедры фармацевтической технологии Института фармации имени А.П. Нелюбина, Центра доклинических исследований и Центра фармацевтических технологий Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова «МИРЭА – Российский технологический университет» протокол № 05 от 18 мая 2022 года.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в постановке задач и их реализации в экспериментальной части. Автором лично проведена разработка состава, проведены исследования физико-химических, биофармацевтических и технологических характеристик лекарственного средства, выбор оптимального состава ЛС, а также разработка технологии получения оригинального ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения». Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе, получены автором самостоятельно и внедрены в практику.

Внедрение результатов в практику

Научно-практические результаты исследования – ОПР на производство (Акт внедрения №128 от 26 апреля 2022 г.) и методики контроля качества (Акт внедрения №129 от 26 апреля 2022 г.) лекарственного средства внедрены в работу ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»; результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре промышленной фармации Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Акт внедрения в учебный процесс от 18 февраля 2022 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств, пунктам 2, 3, 4.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в рамках Государственной программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации», является результатом проделанной работы в рамках конкурса «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (УМНИК) при поддержке Фонда содействия инновациям.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и является фрагментом исследования по теме «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01.2.012.61653).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 8 работ, в том числе 3 научных статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer), 4 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 220 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), выводов, списка литературы, приложений. Работа иллюстрирована 97 таблицами, из них 18 таблиц в приложениях, 38 рисунками. Библиографический указатель включает 150 источников, из них 51 на иностранных языках.

В приложениях вынесен титульный лист ОПР получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения», Акт внедрения ОПР получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения», Акт внедрения методик контроля качества ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения», Акт внедрения научных результатов в учебный процесс кафедры промышленной фармации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Обзор биоразлагаемых полимеров

Биоразлагаемые полимеры (биodeградируемые полимеры) – это полимерные соединения с различными свойствами, которые распадаются при действии микроорганизмов или внешних факторов, путем гидролиза полимера в мономеры [132, 136, 148].

Биоразлагаемые полимеры в отличие от других групп полимеров быстро разлагаются, тем самым не нанося ущерб природе и организму человека. Биоразложение происходит под действием ферментов или химического разрушения, связанного с живым организмом. Этот процесс происходит в два этапа. Первый - это дробление полимеров на частицы с более низкой молекулярной массой посредством абиотических реакций (окисления, фотodeградации или гидролиза) или биотических реакций (разложения микроорганизмами). Затем происходит биоассимиляция фрагментов полимера микроорганизмами и их дальнейшее использование клетками организмов. Подобные свойства встраивания в жизненный цикл клеток человеческого организма нашли применение использования биоразлагаемых полимеров в медицине в качестве перевязочного и сшивного материала [136].

1.1.1. Классификация биоразлагаемых полимеров

Биоразлагаемые полимеры получены либо синтетическим (синтетические), либо биологическим путями (природные). Природные полимеры доступны в больших количествах из возобновляемых источников, в то время как синтетические полимеры производятся из невозобновляемых нефтяных ресурсов. Перспективным направлением медицины является использование природных полимеров в качестве сырья для разработки ЛС, так как их деградация приводит к образованию соединений, не представляющих для человеческого организма угрозы даже в относительно высоких концентрациях [65].

Биоразлагаемые природные полимеры классифицируются на два основных класса соединений – это белки и полисахариды, которые могут быть образованы различными способами животного (от микробного до животного) и природного генеза.

Белки - термолабильные соединения, состоящие из полярных и не полярных α -аминокислот, соединенные пептидной связью. Помимо пептидной связи аминокислоты могут образовывать множество других химических взаимодействий, которые формируют уникальную структуру белка. Источники белка различны. К ним относятся растения (глютен) и животные (коллаген) [109].

Коллаген является основным белковым компонентом соединительной ткани животных. Существует двадцать два типа коллагена. Коллаген состоит из различных полипептидов, которые содержат в основном аминокислоты глицин, пролин, гидроксипролин и лизин. Большая гибкость его структуры достигается при увеличении содержания глицина [120]. Коллаген ферментативно разлагается и обладает уникальными биологическими свойствами. Использованию коллагена в медицинских целях посвящено огромное количество исследовательских работ [109, 120, 124, 129].

Природные полимеры олигосахаридов называются полисахаридами. Они образуются в результате протекания реакции полимеризации сахаров с образованием различных гликозидных связей. Источниками служат растения (крахмал), ракообразные (хитин и хитозан) и другие.

Неуклонный рост интереса в фармацевтической промышленности к биоразлагаемым полимерам на основе полисахаридов, в частности хитозана, связан с возможностью их ферментативного разложения на не токсичные для организма соединения. Исследованиям свойств хитозана в качестве носителя уделяется огромное внимание вследствие возможности иммобилизации в структуру хитозана различных ФС из многих групп [54, 93, 132, 148]. Поэтому были рассмотрены различные модификации полимеров на основе хитозана в качестве применения их в виде носителя ЛС.

Общая характеристика полимеров хитозана

Хитин – это линейный полисахарид, состоящий из мономеров 2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозы, соединенных 1,4-β-гликозидной связью, имеющий смешанную структуру вещества, которая включает как аморфные, так и кристаллические элементы. Хитин называют «производным целлюлозы», которая по химической структуре отличается наличием у хитина у второго атома углерода ацетамидной группировки (у целлюлозы на ее месте имеется гидроксильная группа) [40, 45].

В природе встречаются 3 пространственные формы хитина – это α-, β- и γ-хитин. Отнесение к той или иной форме зависит от пространственного расположения цепей хитина. Самой стабильной и распространенной является α-форма хитина, в которой цепи хитина расположены антипараллельно [85]. Также имеется параллельное расположение цепей у β-формы и две цепи параллельно и одна антипараллельно у γ-формы хитина. Однако β-формы и γ-формы хитина могут превращаться в α-форму [40, 45, 114].

Хитин мало растворим или практически нерастворим в воде, но растворяется в небольшом числе органических растворителей, большая часть которых приводит к деструкции молекул, что затрудняет определение молекулярной массы полимера [45].

Плохая растворимость хитина затрудняет его применение в качестве вспомогательного вещества (ВВ) для производства ЛФ, поэтому в медицине и фармации применяют лучше растворимое производное хитина – хитозан.

Хитозан является производным хитина и представляет собой линейный аминополисахарид, состоящий из мономера - 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкана.

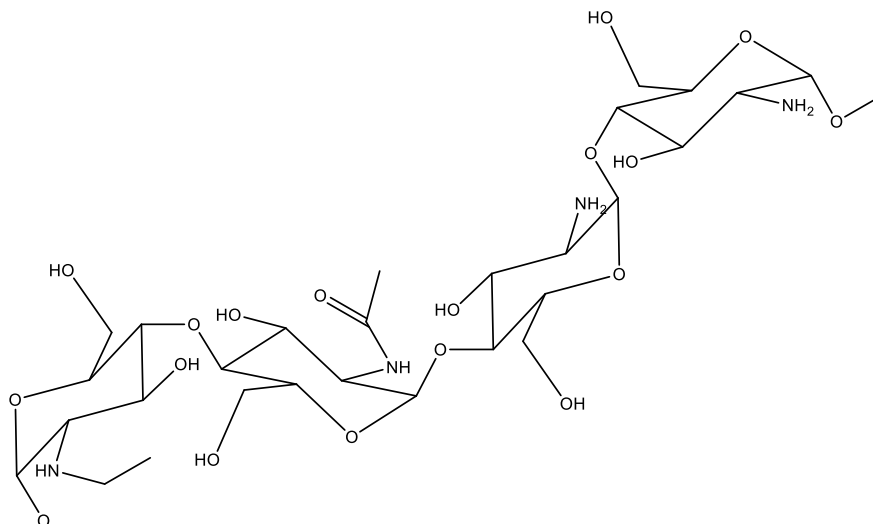


Рисунок 1.1 – Структурная формула хитозана

Технология получения хитозана

Мировой оборот производства хитозана составляет 150-200 тыс. тонн в год, а лидерами в производстве являются такие страны как Япония, КНР, Малайзия, Польша и США. Ведущую роль в мире по исследованию хитозана и хитина, производству данных полисахаридов занимает Япония. Именно в Японии в 1972 году впервые в мире начато промышленное производство хитозана [64]. Получение хитозана – процесс сложный, многоэтапный, но принципиально делится на два основных процесса:

- 1) Выделение хитина из природного сырья
- 2) Получение хитозана из хитина

Выделить хитин возможно из большого числа природных источников, таких как ракообразные, биомасса микроорганизмов, членистоногие, диамантовые водоросли. Самым глубоко изученным и широко применяемым является сырье ракообразных. Самым доступным в нашей полосе сырьем являются грибы [45, 73 74, 75]. Получение хитина из природного сырья проходит по схеме, указанной на Рисунке 1.2., а химическое превращение из хитина в хитозан представлено на Рисунке 1.3.

Подготовка сырья заключается в измельчении, просеивании и фракционировании природного сырья. Обесцвечивание проводят органическими растворителями (например, этиловым спиртом). Также эта стадия позволяет освободить сырье от липидной фракции. Стадия

деминерализации полупродукта освобождает сырье от минеральных солей. Эта стадия очень важна, так как минеральные соли, содержащиеся в сырье, влияют на физико-химические характеристики как хитина, так и хитозана. Далее идет стадия депротеинирования, на которой полупродукт хитина освобождается от белков, содержащихся в сырье. Также важно на этом этапе сохранять низкую температуру процесса, что является важным для сохранения нативной структуры полимера. И, наконец, очистка продукта от примесей [64, 73, 74].

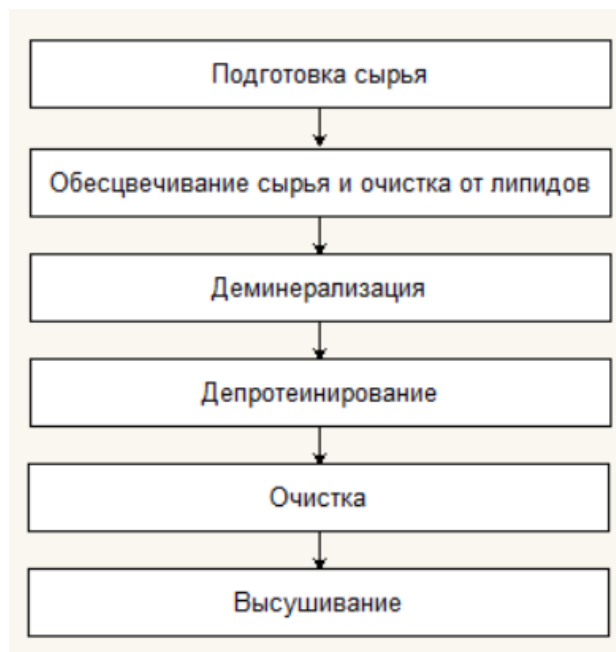


Рисунок 1.2 – Технология получения хитина

Получение самого хитозана заключается в дезацетилировании хитина в сильнощелочных условиях с применением гидроксида натрия с массовыми концентрациями 40-49% при температуре 110-140 °С с интервалом по времени проведения процесса равным 4-12 часов. Процесс дезацетилирования хитина проводят в сильнощелочных условиях по причине аксиального положения ацетамидной группировки в молекуле [45, 64, 75, 132]. Такое резкое различие в интервале времени процесса, температуры и концентрации натрия гидроксида зависит от степени дезацетилирования и молекулярной массы конечного полимера, потому что реакция дезацетилирования сопровождается разрывом гликозидных связей полимера [45, 64, 147]. Помимо метода получения описанного выше также существует еще несколько методов получения хитозана, такие как ферментативный способ, при помощи хитиндезацетилазы [75, 132], но этот метод сопряжен с очень дорогим способом получения фермента, поэтому его применение не широко.

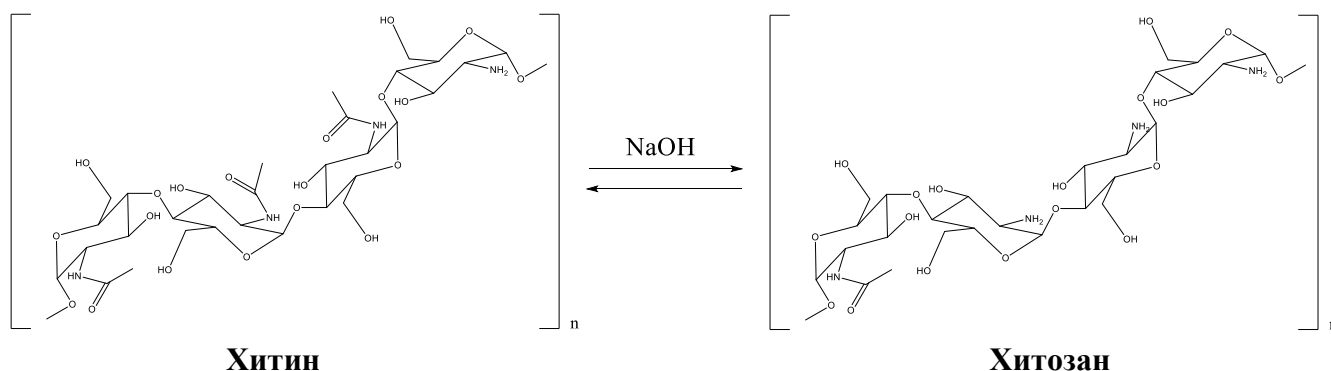


Рисунок 1.3 – Получение хитозана из хитина в сильнощелочных условиях

1.1.2. Биологические свойства и активность хитозана

Полимеры хитозана обладают огромным количеством положительных для медицины свойствами, такими как биodeградация ферментными системами человеческого организма, биосовместимость с клетками. Однако эти свойства изменчивы в зависимости от формы хитозанового скелета.

Так известно, что процесс метаболизма молекул скелета хитозана зависит от степени дезацелирования полимера. Авторами статей [85, 132] исследован основной метаболический путь деградации хитозана через неспецифический ферментативный комплекс лизоцима. Авторами исследований было установлено, что полностью дезацетилованный хитозан не может быть разложен лизоцимом вследствие отсутствия трех последовательно ацетилированных звеньев в молекуле [132]. Результаты исследований [75, 132, 148] свидетельствуют, что низкая токсичность связана с метаболическим путем, а конкретно с ферментативной системой, осуществляющей биodeградацию скелета, продукты которой способны к дальнейшей деградации иными ферментативными системами организма, а затем легко абсорбируются организмом.

Тщательный и подробный анализ структуры хитозана позволяет определить функциональность и способ применения таких структур, что возможно благоприятно скажется при разработке лекарственных средств на его основе.

Также хитозан обладает разнонаправленной активностью, которая включает антибактериальную, гипохолестемическую, иммуномодулирующую, гемостатическую, противоопухолевую. В основном данные активности хитозан приобретает благодаря либо свободной аминогруппе в скелете биополимера, либо связанной липофильностью, которая возрастает с увеличением молекулярной массы. Например, антибактериальную, гемостатическую активность связывают с наличием у биополимера свободных групп, а вот гипохолестемическую активность связывают с липофильностью скелета хитозана [38, 49, 67, 105, 126].

Хитозан обладает антибактериальной активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий (*E. coli* и *S. aureus*). Также учеными установлено, что соединения хитозана проявляют антимикотическую активность, направленную на некоторые виды грибов рода *Candida albicans* [31]. Предполагается, что механизм антибактериального и фунгицидного действия хитозана связан с его способностью взаимодействовать с отрицательно заряженными поверхностными структурами клеток [85]. Хитозан в водорастворимом состоянии положительно заряжен по причине воздействия протонов кислот на аминогруппу в структуре молекулы полимера, из-за чего молекула переходит в ионизированное, растворимое состояние [59, 85]. Также возможно предположить, что величина заряда ионизированного полимера прямо пропорциональна молекулярной массе, что достаточно логично и подтверждается исследованиями [46, 132]. В исследованиях [46] установлена взаимосвязь антимикробной активности и ее корреляция с полимизацией и молекулярной массой водорастворимых полимеров хитозана.

В исследованиях [67, 126] обнаружена взаимосвязь хитозана и систем свертывания крови. Гемостатическую активность хитозана связывают с возможностью хитозана активировать все системы свертывания, благодаря массовой адсорбции белков и тромбоцитов на поверхности полимера. То есть при контакте с кровью хитозан помогает образовать сгусток на своей поверхности, который и закупоривает вену, за счет того, что он концентрирует эритроциты, факторы свертывания крови и тромбоциты в месте кровотечения [126], также полимер несет положительный заряд, что способствует свертыванию крови и стимулирует выделение вазоконстрикторных веществ [67].

Гипохолестеринемическая активность хитозана, которая проявляется при пероральном применении, предположительно связана наличием аминогрупп, расположенных в структуре молекулы. Фармакологическое действие подобно группе секвистрантных лекарственных средств – образуется комплекс хитозана и желчных кислот (в том числе и с холестерином), который не всасывается в кишечнике, что нарушает энтерогепатическую циркуляцию желчных кислот. Анализ проведенных исследований показал, что гипохолестеринемическая активность хитозана зависит от степени дезацетилирования [92, 105].

1.1.3. Физико-химические свойства различных структур полимеров хитозана

Основными факторами, оказывающими влияние на физико-химические свойства полимеров хитозана, являются степень дезацетилирования и молекулярная масса полимера [45, 75, 132].

Учеными было установлено, что растворимость хитозана в воде довольно низкая, по сравнению с его солевой формой, получаемой путем растворения хитозана в растворах кислот. Также нужно отметить, что хитозан и любая его протонированная солевая форма не растворима в растворах щелочей. При взаимодействии таких форм хитозана с раствором щелочей образуется осадок [53, 94, 116].

Существующие модификации хитозана возможно разделить на две группы по способам получения – это ковалентные и нековалентные модифицированные структуры [53, 55, 94, 101, 116].

Нековалентно-модифицированный хитозан приводит к образованию различных комплексов и водорастворимых солевых форм полимера, по ионному и водородному типу образования межмолекулярных связей. Данный тип модификаций позволяет иммобилизовать различные лекарственные средства на полимерной структуре хитозана, что обуславливает применение растворимых форм хитозана в качестве носителя фармацевтических субстанций различной природы [53, 94, 108, 116]. Также данный тип модификаций при данном структурном составе молекулы хитозана, наличие свободной амино группы, позволяет образовывать связи с огромным количеством кислот, которые переводят хитозан в растворимую форму. Виды не ковалентного взаимодействия представлены на Рисунке 1.4.

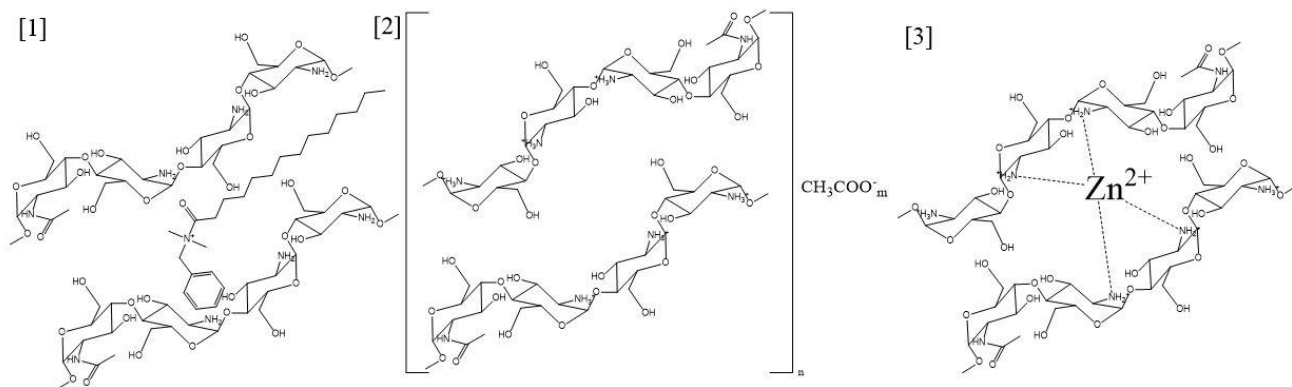


Рисунок 1.4 – Виды нековалентного взаимодействия хитозана

Ковалентная модификация хитозана возможна по двум типам групп – это свободной амино группа и гидроксильных групп, которые приводят к различным физико-химическим и структурно механическим изменениям свойств [84]. Модификация свободной химического центра аминогруппы приводит к снижению степени дезацетилирования, снижению рКа, и как следствие возрастанию липофильности полимера [84]. Ковалентная модификация путем дериватизации гидроксильных групп хитозана может протекать при помощи реакций, направленных на ковалентное взаимодействие с гидроксильными группами, приводящее к образованию эфиров хитозана. Модификация гидроксильной группы приводит к увеличению массы полимера.

Модификации можно добиться взаимодействием с жирорафатическими ангидридами в присутствии катализаторов с получением полностью ацилированных производных [84]. Модификация обеих групп приводит к полной липофилизации молекулы [132]. Одним из способов модификации по обоим группам является полное ацилирование хитозана, приводящее к снижению растворимости полимера в кислой среде. Схема реакции полного ацетилирования представлена на Рисунке 1.5.

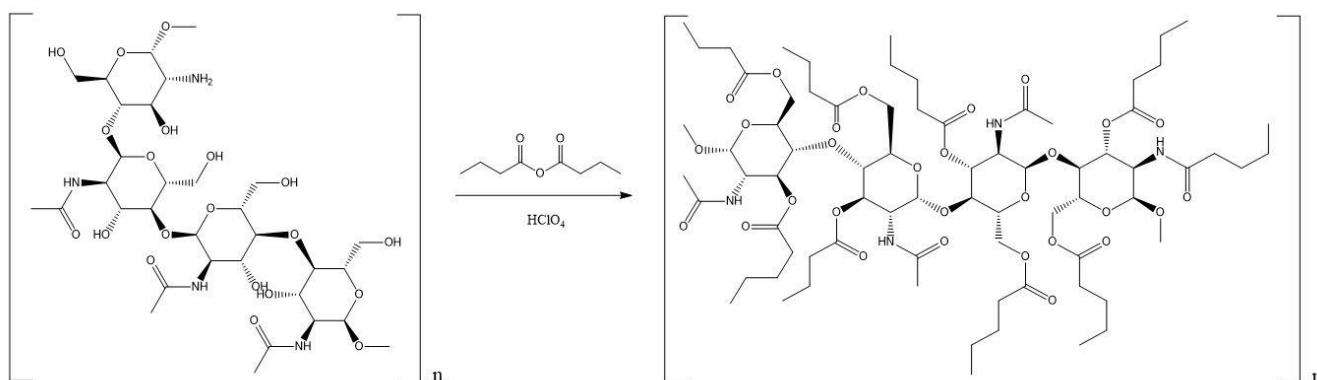


Рисунок 1.5 – Схема получения полностью ацетилированного хитозана

Модификацию хитозана направленную на гидроксильные группы возможно осуществить при помощи реакции карбоксиметилирования. Данная модификация цепи достигается при взаимодействии монохлоруксусной кислоты с хитозаном. В результате этой реакции образуется производное, обладающее амфотерными свойствами [55, 84, 111]. Модификация гидроксильной группы практически не влияет на растворимость полимера или напротив повышает ее, все будет зависеть от структуры молекулы деривата, который будет присоединен. Однако получение модифицированных структур только по гидроксильной группе очень сложный процесс, требуется защита аминогрупп от воздействия дериватов [84, 101, 142]. Схема реакции получения N,O-карбоксиметил производные хитозана представлена на Рисунке 1.6. Такая ковалентная модификация приводит к снижению растворимости полимера и повышению липофильности.

Гидрогели N,O-карбоксиметил производных хитозана растворенные в альгинате натрия и затем сшитые генипином, обладают рН-чувствительностью, а также могут способствовать высвобождению различных белковых структур при рН 1,2 и 7,4, на 20 % и 80 %, соответственно [84, 101].

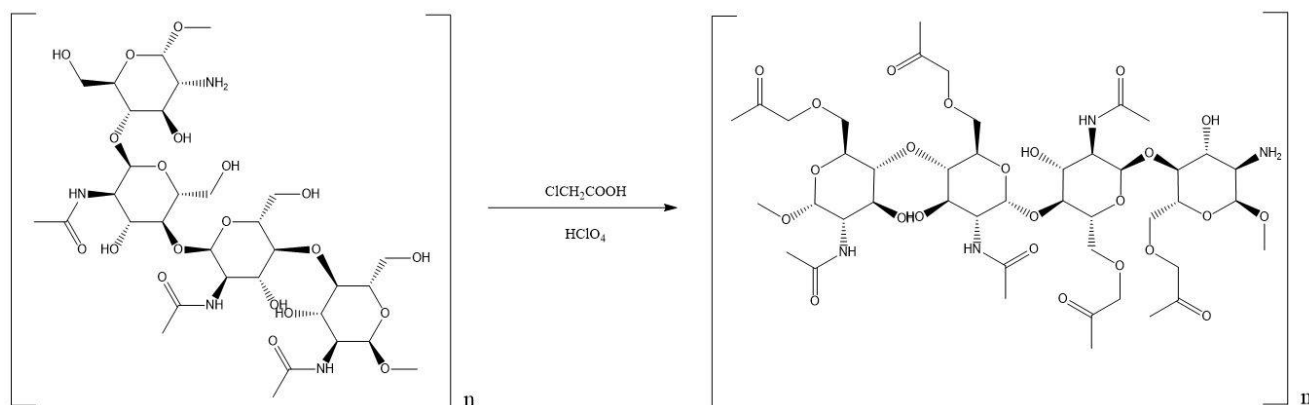


Рисунок 1.6 – Схема реакции получение N,O-карбоксиметил производного

Ковалентная модификация amino группы приводит к снижению растворимости полимера и повышению липофильности, за счет взаимодействия со свободными amino группами, которые и подвергаются ионизации в кислой среде. Модификацию хитозана с участием amino группы возможно провести при помощи различных альдегидов, ангидридов, карбоновых кислот, которые могут взаимодействовать с amino группой полимера [84, 132].

Ковалентное взаимодействие хитозана с альдегидами приводит к образованию оснований Шиффа [84, 117, 132]. Это приводит к получению соединения более липофильного характера на основе хитозана по сравнению с изначальной структурой, которое труднее растворяется или вообще не растворимо в водно-кислой среде. По причине своей высокой липофильности [84, 117] в модифицированный по amino группе хитозан возможно иммобилизовать ферменты и различные липофильные ФС. Однако основания Шиффа разлагаются в сильно кислотной среде, что дает преимущества для дальнейшей биodeградации полимера [84]. Схема реакции образования оснований Шиффа, на примере скелета хитозана представлена на Рисунке 1.7.

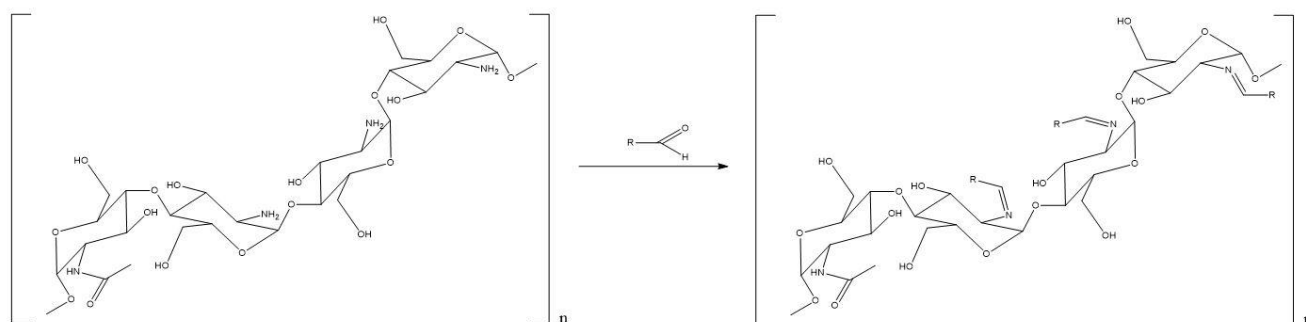


Рисунок 1.7 – Схема реакции получения оснований Шиффа

Также возможна реакция, которая производит «сшивание» двух цепей хитозана путем действия диальдегидов на amino группы с образованием оснований Шиффа [84], с вовлечением двух структурных молекул хитозана, которая представлена на Рисунке 1.8. Такой метод получения ковалентно-модифицированного хитозана способен повысить липофильность

соединения и увеличить его молекулярную массу, это возможно отнести к преимуществам данного метода [84, 132]. Однако существуют недостатки любой ковалентной модификации хитозана по амино группе, такие как снижение антибактериальной активности. Как показали исследования, она зависит от количества свободных амино групп в молекуле хитозана [84, 132, 75]. Также вероятно повысится токсичность полимера, из-за введения в его структуру иных соединений, нарушающих его биodeградацию [84].

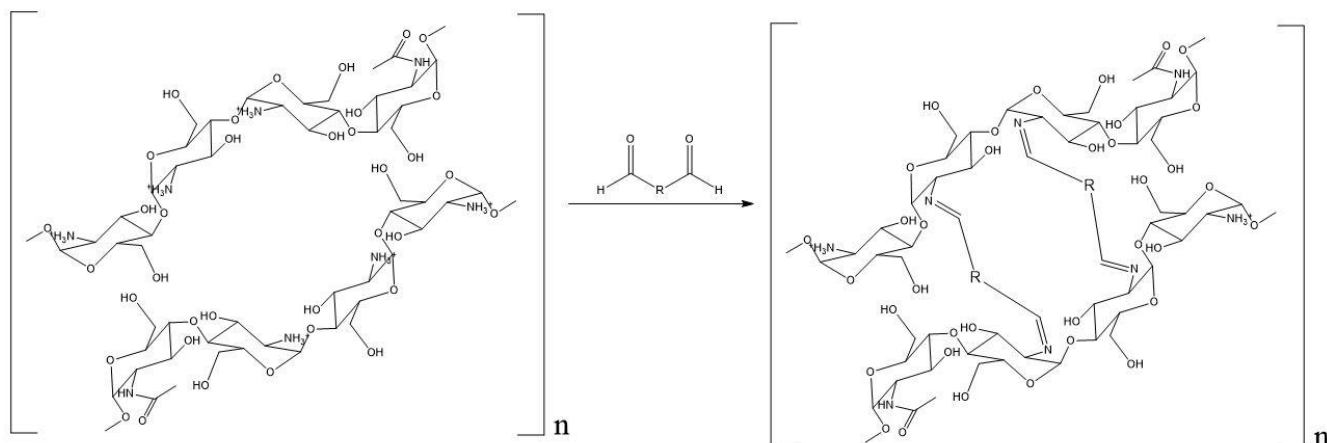


Рисунок 1.8 – Схема реакции получение «ковалентно-сшитого» хитозана

Основания Шиффа разлагаются в сильно кислой среде [132], что дает возможность растворится модифицированной форме хитозана при взаимодействии с биожидкостями организма, если достигается уровень кислотности ($pH < 6$), например в ране [84].

1.1.4. Хитозан в качестве носителя фармацевтических субстанций

Исследованиям свойств хитозана в качестве носителя ФС на сегодняшний день уделяется огромное внимание вследствие возможности иммобилизации в структуру хитозана различных лекарственных средств из многих групп. Такими группами являются ФС, представленные молекулами с невысокой молекулярной массой, в том числе антибиотики и цитостатики, а также ЛС на основе ионов металлов и ферментативных комплексов. Также на свойства хитозана в качестве носителя ЛС влияют проделанные модификации структуры полимера, которые описаны ранее.

С тех пор как хитозановый скелет подвергается ковалентной и не ковалентной модификации, его начали использовать в разработке ЛС в качестве носителя и модификатора высвобождения. Так как при помощи данного модифицированного полимера удается добиться постепенного высвобождения ФС из ЛФ. По сравнению с другими способами модификации высвобождения полимеры хитозана являются одной из наиболее изученной и безопасной системой [110]. Известны также возможности хитозана снижать побочные эффекты ЛС [110].

Так показано, что ЛС на основе хитозана эффективно уменьшают побочные эффекты, сопровождаемые употреблением антибиотиков [104, 106, 118, 128, 133]. Сравнительные исследования высвобождения геля нековалентно сшитого хитозана с полиэтиленгликолем и антибактериальными ЛС, обнаружили, что полученный гидрогель высвобождал 31,5 % ФС в течение 10 минут, в то время как у традиционного ЛС данный показатель достигал 44,7% за тот же промежуток времени. Однако через 90 минут не было очевидной разницы между двумя системами доставки. [106].

Полимеры хитозана возможно применять в качестве носителя анестетических ФС. По химической структуре местные анестетики можно разделить на амиды и сложные эфиры [110, 122, 141]. Однако амиды являются наиболее часто используемыми средствами для местной анестезии в клинике. В основном они включают лидокаин, левобупивакаин, бупивакаин, мепивакаин и ропивакаин. С другой стороны, сложные эфиры в основном включают бензокаин, тетракаин и кокаин. Применение полимеров хитозана в качестве носителя анестетических ФС, позволяют эффективно увеличить продолжительность анестезии, без дополнительного введения дозы анестезирующего ЛС.

В исследовании [130] изучены пленки на основе нековалентно связанного комплекса хитозана и коллагена с контролируемым высвобождением ФС. Эта пленка имела хорошие характеристики набухания и водопроницаемости. Это стало достижимо за счет взаимодействия между группами $-NH_2$, $-OH$ и $-COOH$, которое заменяет водородные связи в основа биомолекулы. Последующие исследования высвобождения лекарственного средства показали, что гидрогелевая пленка является носителем рН-зависимого высвобождения для местных анестетиков (лидокаина, бензокаина и гидрохлорида тетракаина), и высвобождение может продолжаться до 24 часов. Более того действие анестезии возможно было прекратить, изменив среду высвобождения на кислую или щелочную.

Противоопухолевые препараты, которые могут переноситься и доставляться гидрогелями хитозана, включают доксорубин, полиоксометаллаты, куркумин, 5-фторурацил. Последующие исследования высвобождения лекарственного средства *in vitro* показали, что вышеуказанный гидрогель эффективно регулирует высвобождение лекарственного средства на основе различных значений рН. Исследования цитотоксичности показали, что гидрогель, содержащий 5-фторурацил, оказывает хорошее ингибирующее действие на рост клеток НерG2 и может эффективно индуцировать апоптоз раковых клеток [100, 12].

Полимеры хитозана возможно применять в качестве носителя ионов тяжелых металлов. Так учеными был исследован комплекс хитозана содержащий ионы серебра обладающий противомикробной активностью. Противомикробную активность проверяли *in vitro* на чашках петри и *in vivo* на крысах. ЛС на основе хитозана показало эффективность в тестах *in vitro*. [100].

Полимеры хитозана возможно применять в качестве носителя ферментативных комплексов за счет образования нековалентных взаимодействий с хитозаном. Тем самым не препятствуя активности ферментативного комплекса. Учеными в исследовании [100] проведена разработка наночастиц на основе хитозана и нейтральной протеиназы с конечной активностью фермента 84,3% от начальной активности фермента в той же дозе.

1.2. Анализ основных представителей лекарственных средств энзиматической природы

В настоящее время лечение гнойно-некротических ран различного генеза представляет серьезную клиническую и социальную проблему [34]. Существует два способа лечения таких ран – хирургическое и медикаментозное лечение ран. Данные способы лечения не конкурирующие, а взаимодополняющие компоненты комплексной терапии раны [16, 36, 58].

Традиционно при медикаментозном лечении гнойных ран используются мази. Также в статьях [15, 32, 62, 97] отмечают, что в медицинской практике применяются лекарственные вещества на бензилпенициллина, полусинтетических пенициллинов, цефалоспоринов и аминогликозидов I-II поколений. Также широко распространено использование давно известных препаратов для местного лечения ран: гипертонического раствора хлорида натрия, мази Вишневского, ихтиоловой мази, стрептоцидовой, тетрациклиновой, фурациллиновой, гентамициновой мази на жировой основе. Однако они не в полной мере оправдывают ожидания, вследствие мало эффективности, что является одной из ведущей причиной, отражающей уменьшение распространения их назначения медицинскими работниками [15, 32, 34].

Также многие ЛС, наносимые на повязку в виде растворов (гипертонический раствор хлорида натрия, мочевины, фурациллина, диоксидина), через 2-3 часа высыхают, инактивируются раневым экссудатом. Именно поэтому местное применение растворов различных антимикробных препаратов и ферментов малоэффективно [15, 62].

Другим недостатком медикаментозного лечения под повязкой с использованием традиционных препаратов заключается в том, что большинство из них обладают однонаправленностью действия: только осмотическим (гипертонические растворы, однокомпонентные сорбенты), только антибактериальным (антибиотики, антисептики) или, в основном, некролитическим (ферменты). В последние годы в клиническую практику для лечения ран внедрены новые ЛФ с разно направленным действием [15].

Разработки современных и эффективных ЛС с комплексом фармакологических активностей ведутся по различным направлениям. Одним, из которых является разработка лекарственных средств, содержащих иммобилизованные ферменты. Препараты иммобилизованных ферментов целесообразно использовать в раневом процессе не только для

очищения раневой поверхности от детрита, но и с целью подготовки ран к наложению вторичных швов, что позволяет значительно уменьшить продолжительность лечения и добиться заживления раны по типу первичного натяжения в 92-98 % случаев [16, 33, 43, 65].

Ферментативные ЛС на основе микробного генеза принимают участие в качестве регулятора важнейших биохимических процессов клетки организма, таких как деградация ферментов и белков, транслокация и секреция белков, морфогенез фагов [35, 52, 65].

На основании данных, представленных на сайте Государственного реестра лекарственных средств Российской Федерации, был установлен список ферментативных средств для лечения ран, зарегистрированных на территории Российской Федерации [11]. Список ЛС представлен в Таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Ферментативные ЛС, разрешенные к обороту на территории Российской Федерации

ФС	ТН	Лекарственная форма	Состав лекарственного средства
Гиалуронидаза	Биогиал Ронидаза Лонгидаза Лидаза Лидаза-М	Лиофилизат для приготовления раствора	Гиалуронидаза
	Лонгидаза	Суппозитории	Бовгиалуронидаза азоксимер (лонгидаза), масло какао
Коллагеназа	Коллализин	Лиофилизат для приготовления раствора	Коллагеназа
	ИРУКСОЛ	Мазь для наружного применения	Клостридиопептидазы А 0,6 МЕ и хлорамфеникола 10 мг; Липофильная безводная мазевая основа
Трипсин	Трипсин кристаллический	Лиофилизат для приготовления раствора	Трипсин
Химотрипсин	Химотрипсин	Лиофилизат для приготовления раствора	Химотрипсин
Трипсин, Химотрипсин	Химопсин	Лиофилизат для приготовления раствора	Трипсин, Химотрипсин

Из Таблицы 1.1. видно, что практически все зарегистрированные ЛС на территории РФ представлены лекарственными формами на липофильной основе (суппозитории, мази) или индивидуальным препаратами ферментов для приготовления растворов для наружного применения (лиофилизаты). Это связано с тем, что ФС ферментативной природы представляют собой липофильные соединения.

Для лечения гнойно-воспалительных ран возможно применение ЛС на основе двух классов ферментов, влияющих на гидролиз олиго- и полисахаридов (Гиалуронидаза) и обладающих амилазной активностью. Такие лекарственные средства применяются для стимулирования рубцевания раны. Второй класс применяемых при лечении ран называют протеолитическими ферментами. К этому классу относят такие ферменты как трипсин, колагеназа, которые влияют на разрушение пептидных связи в субстрате белков. Механизм действия основан на так называемой технологии обработки дна для удаления некротического компонента и перехода хронической раны в острую и последующее очищение раны [56]. Также отмечается, что лекарственные средства содержащие ферменты способствуют разжижению экссудата, усиливая эффективность медикаментозной терапии. [56, 90]. Рассмотрим каждую фармацевтическую субстанцию на основе ферментов, которые представлены в Таблице 1.1.

Гиалуронидазы -это ферменты, разрушающие С1 – С4 связь гиалуроновой кислоты, которая составляет важную часть внеклеточного матрикса. Первоначально обнаруженные в бактериях, гиалуронидазы, как известно, широко распространены в природе и были найдены во многих классах, включая насекомых, змей, рыб и млекопитающих. У человека были идентифицированы шесть различных гиалуронидаз: HYAL1-4, HYAL-P1 и PH-20. Среди которых последняя обладает сильнейшей биологической активностью [123, 146].

В РФ зарегистрировано большое количество препаратов на основе гиалуронидазы [11]. Все лекарственные средства на основе гиалуронидазы в большинстве случаев получают в лекарственной форме: лиофилизат для приготовления растворов и применяются для лечения ожоговых, травматических, послеоперационных рубцов. Также существует иммобилизованный аналог гиалуронидазы – бовгиалуронидаза азоксимер. Этот иммобилизованный аналог дает возможность применять его в форме ректальных суппозиторий для лечения длительно незаживающих ран слизистой. Данную возможность связывают с иммобилизацией фермента в липофильный носитель, что изменяет кинетику высвобождения и приводит к более равномерному высвобождению и доставке фермента к цели.

Также улучшения при лечении длительно незаживающих ран связывают с тем, что специфическим субстратом гиалуронидазы являются глюкозамины, а это не только гиалуроновая кислота, но и хондроитины (хондроитин, хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат). Все эти вещества составляют основу внеклеточного матрикса соединительной ткани. В результате деполимеризации глюкозаминоглюканы изменяют ее основные свойства, что приводит к снижению вязкости, уменьшению способности связывать: воду, ионы металлов, временно увеличивается проницаемость ткани, облегчается движение жидкости в межклеточном пространстве, что приводит к разжижению экссудата, увеличению эластичности соединительной ткани, и в конечном итоге к уплотнению рубцов [123, 146].

Коллагеназа – специфический протеолитический фермент, разрушающий пептидные связи в природном коллагене, основном структурном элементе соединительной ткани. По источнику получения фармацевтическая субстанция коллагеназы относится к биотехнологическим средствам, так как сырьем являются культуры микроорганизмов или пищеварительные железы животных, из которых проводится экстракция нативного соединения [56, 69, 56, 78, 146].

Также существовали лекарственные средства Iruhol® и NORUXOL® мази для наружного применения на основе коллагеназы и других активных компонентов на безводной мазевой основе, которая предполагает высокую липофильность фармацевтических субстанций, входящих в состав мази. Однако они исключены из государственного реестра лекарственных средств РФ.

Трипсин способен расщеплять пептидные связи не только денатурированных белков, но и живых клеток при высоких концентрациях. Однако существует два механизма защиты ткани от повреждающего действия трипсина. Клетки в очаге раны способны вырабатывать не только трипсин, но и поливалентный ингибитор протеиназ, и при нарушении равновесия клетки начинают вырабатывать дополнительное количество ингибитора, который нейтрализует опасный избыток трипсина [56]. Этот механизм действует на границе между живой и поврежденной тканью [149]. Поэтому добавление экзогенного трипсина ускоряет очищение раны, не создает дополнительную нагрузку на организм, которому необходима защита от генерализации инфекции и восстановление утраченных мягких тканей. [149, 76].

В РФ ассортимент лекарственных средств на основе трипсина представлен в виде трипсина кристаллического (ЛФ – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения), полученного из поджелудочной железы крупного рогатого скота. [11]. Показания к применению трипсина включают лечение гнойных ран и ожогов, благодаря протеолитическому действию на белки и пептиды омертвевших тканей, снижая тем самым вязкость секрета и экссудата раны [32].

Химотрипсин – протеолитический фермент, гидролизующий белки и пептиды с образованием низкомолекулярных пептидов и аминокислот. В медицинской практике применение химотрипсина основано на его специфической активности расщеплять некротические ткани и фиброзные образования, разжижать вязкие секреты и экссудаты [140].

Химопсин - ферментный препарат комплексного протеолитического действия. Активными действующими веществами являются химотрипсин и трипсин, обладающие протеолитической активностью.

Данное сочетание протеолитических ферментов имеет максимальный протеолитический эффект в первую стадию воспаления, поскольку на последующих стадиях блокируется антитрипсином, который имеет сродство к трипсину и химотрипсину. Также нужно упомянуть

об механизме, который при высокой концентрации химопсина приводит к увеличению содержания антитрипсина, что способствует снижению кислотности воспалительной среды. В целом, химотрипсин у пациентов с острой травмой снижает воспалительный отек и разрушение тканей, что, в свою очередь, способствует быстрому заживлению [140, 102]. Показания к применению трипсина включает лечение гнойных ран и ожогов [11].

Многочисленные клинические испытания подтвердили эффективность и безопасность химопсина при лечении воспалительных заболеваний и отека, повреждений тканей различных типов, таких как случайные травмы, хирургические и ортопедические травмы, ожоги [107, 121].

В экссудативной жидкости раны все низко и высоко молекулярные соединения находятся в хаотическом движении, поэтому возможность взаимодействия ферментативного препарата и белковых или пептидных молекул определяется вероятностью их столкновения [76]. При большой концентрации денатурированного белка в ране происходит, в основном, фермент-субстратное взаимодействие, иными словами протеолитическое взаимодействие с белковыми и пептидными структурными элементами, то есть субстратом [65, 76]. По мере очищения раны от белковых и пептидных структурных элементов все чаще происходит автолиз. К моменту полного очищения раны в ней практически не остается ни субстрата, ни трипсина. [65, 96].

Данные, приводимые в литературе [42], убедительно доказывают, что очищение гнойно-некротических ран под влиянием ферментативных ЛС, особенно коллагеназы и эластазы, эффективно.

1.3. Лекарственные формы и основные способы применения лекарственных средств на основе хитозана в дерматологической практике

Хитозан имеет широкое применение, но в качестве действующего вещества его возможно применять в малом перечне направлений, таких как энтеросорбенты [79, 113, 114] и кровоостанавливающих [72] ЛС. В основном хитозан применяют в качестве вспомогательного вещества, из-за его благоприятных физико-химических свойств, а также хорошей биосовместимости и биodeградируемости.

Хитозан проявляет активность в качестве энтеросорбента в ЖКТ и применяется в качестве пищевой добавки [45, 46]. Авторами статьи [14] предложен способ применения хитин-глюканового комплекса в качестве сорбента при отравлении неотормыми канцерогенными веществами.

Применение хитозана в качестве вспомогательного вещества основано на двух структурно-механических формах: твердой, которая включает различные пленки, твердые каркасы, и жидкой, основанной на применении гелей различного состава. При производстве

гелевых форм хитозана нужно учитывать, что при возрастании рН, раствор геля становится менее густым, поэтому при испарении воды из геля возможны изменения структурно-механических свойств. Гели хитозана применяют для производства ЛС по нозологиям: офтальмология [63], стоматология [77], интраназальное применение [99].

Анионные комплексы хитозана представлены гелями различной вязкости. Вязкость зависит от рН среды растворения, в которую помещен полимерный комплекс. Поэтому в медицинской и фармацевтической практике применение геля на основе хитозана, в качестве вспомогательного компонента, является актуальным. Однако гель на основе хитозана имеет ограниченное фармакологическое действие, поэтому применяют комплексы на основе хитозана и различных лекарственных средств, которые иммобилизованы в его полимерную основу. На основе данного подхода разработаны несколько фармацевтических субстанций таких как хитозан/мирамистин и хитозан/химопсин, которые уже зарегистрированы на территории РФ [18, 19].

Также гель хитозана применяют для получения комплексных лекарственных средств, которые по фармакологическому действию относятся к ранозаживляющим, дерматологическим, стоматологическим, противомикробным гелям различного состава.

Также известны составы, где в качестве действующих веществ выступают липофильные соединения взаимодействующие с хитозаном при помощи водородных связей [13, 18, 19, 20, 34, 144].

Однако для получения стабильных хитозановых гелей, отвечающих требованиям нормативной документации, требуется добавление других вспомогательных веществ. К таким вспомогательным веществам относятся группы веществ, влияющие на вязкость, набухание и предотвращающие образование конгломератов хитозана. Гели на основе хитозана применяются в качестве антибактериальных, ранозаживляющих средств, для лечения ожогов.

Гели на основе производных хитозана обладают различными свойствами, которые зависят от присоединённых функциональных групп к скелету полимера. Существует возможность модификации двух типов групп – это гидроксильные (например карбоксиметилхитозан), аминогруппы (например сукцинилхитозан). Также существуют полимеры хитозана, замещенные по гидроксильным и аминогруппам (например N-сукцинил-O-карбоксиметил, N,O-карбоксиметил-хитозана).

Гели карбоксиметилхитозана обладают амфотерными свойствами, поэтому в них можно иммобилизовать вещества кислого и щелочного характера, а также липофильного, по причине высокой липофильности хитозана [132]. Примером может служить применение карбоксиметилхитозана в офтальмологических гелях и растворах в качестве вспомогательного вещества [21, 63].

Изучено высвобождение салицилатов из гидрогеля на основе структурированного карбометилхитозана, которое показало, что при $pH = 1$ за 120 часов высвобождение субстанции составило 83% [145]. Также проведена оценка набухания и сорбции $Cu(II)$ этого полимера [150]. Пространственно структурированный карбоксиметилхитозан также применялся и в качестве носителя для создания препарата имидоклоприда. Препарат имел высвобождение 6 суток [112]. Пленки, изготовленные из данного типа гидрогелей, чувствительны к pH и применялись для изолирования *in vitro* прометазина гидрохлорида [138].

Практически у всех модифицированных хитозанов (N -сульфохитозана, частично N -ацетилированный хитозана, N,O -карбоксиметил-хитозана) обнаружена гемостатическая активность. Также у перечисленных аналогов была изучена адгезия и морфология частиц крови при контакте с полимерами [93, 82, 125]. Существуют и другие модифицированные соединения хитозана, которые применяются в качестве вспомогательного вещества при получении лекарственных средств.

Установлено, что в хитозановый гель возможна иммобилизация липофильных структур или молекул [132]. Комплексное лекарственное средство гель хитозана с таурином и аллантаином показало лучшее ранозаживляющее действие по сравнению с аналогами [50]. Дзамещенный N -сукцинил- O -карбоксиметил хитозан был использован в качестве матрицы для иммобилизации лекарственной субстанции противоопухолевого действия — каптоптецина [93, 131].

Разработки лекарственных средств на основе губчатых конструкций хитозана ведутся по 2 направлениям: создание гемостатических губок [12, 66] и конструкций для имплантации в живые ткани [119, 137].

При разработке составов ученые сталкиваются с невозможностью применения немодифицированных форм хитозана, из-за неустойчивости получаемой губчатой конструкции. Известно применение различных модификаций в производстве [12, 66]. Однако существует значительное отрицательное действие на хитозановый скелет, которое влияет при одних модификациях на антибактериальное действие, а при других влияет на способность к биодegradации и биосовместимости.

Среди зарегистрированных комбинированных губок в настоящий момент на территории Российской Федерации существует 2 производителя: ООО МК Коллахит с торговым наименованием Коллахит (основанный на комплексе коллагена и хитозана) с различными составами: Коллахит-ФА (содержащий в составе фурагин калия и анилкин), Коллахит-Ш (содержащий шиконин), Биотекфарм с торговым наименованием ХитоПран® (основанный на комплексе хитозана и полиэтиленгликоля). Все перечисленные медицинские изделия с

гемостатической активностью представляют собой комплекс хитозана с различными вспомогательными веществами.

Получение твердых каркасов на основе хитозана, таких как губки осложнено тем, что при их получении требуется использование добавок для увеличения стабильности получаемого ЛС [39, 54, 71, 81]. Однако хитозан в твердых каркасах без добавления полимеров нашел применение в производстве скаффолдов для трансплатации [60, 119, 137].

Разработки пленок на основе хитозановых производных распространены довольно широко. В основном такие пленки применяются в качестве лекарственного средства для заживления ран или для модифицированного высвобождения активных действующих веществ [60, 132, 135].

1.4. Биофармацевтические и технологические аспекты, влияющие на качество и эффективность лекарственного средства

Биофармацевтические и технологические аспекты диктуются создаваемой лекарственной формой и закладываются на этапе разработки лекарственного средства [10, 28, 98].

Биофармацевтические аспекты при фармацевтической разработке устанавливают зависимость между лекарственной формой и эффективностью ЛС. Поэтому биофармацевтические факторы с последующей оценкой их влияния играют значительную роль в определении качества лекарственного средства.

Под биофармацевтическими факторами понимают совокупность *in vivo* и *in vitro* исследований для доказательства эффективности применения лекарственного средства, которые обычно называют биофармацевтическими исследованиями [98]. Биофармацевтические исследования обычно включают в себя исследования растворимости для определения высвобождения ФС.

Технологические аспекты при разработке устанавливаются согласно вида ЛФ и способа ее применения [10]. Требования к технологическим факторам для различных ЛФ определены в нормативной документации на ЛФ, следует отметить, что для каждой формы они имеют существенные различия. Так, например, для ЛФ Таблетки покрытые пленочной оболочкой требуется определение таких технологических параметров, как истираемость, прочность на раздавливание, распадаемость, дисперсионность частиц порошка для Таблетирования, влияющих на качество [10]. Для этого требуется научно-обоснованный подход к разработке ЛС. Таким образом достигается принцип «качество, запланированное при разработке» известный как QbD [98].

На биофармацевтические и технологические свойства также влияют факторы, зависящие от состава ЛФ. Таким образом, можно говорить о взаимосвязи биофармацевтических, технологических факторов и влияния состава на качество ЛС. Взаимосвязь факторов и качества можно представить с помощью диаграммы Исикавы (Рисунки 1.9. и 1.10.).

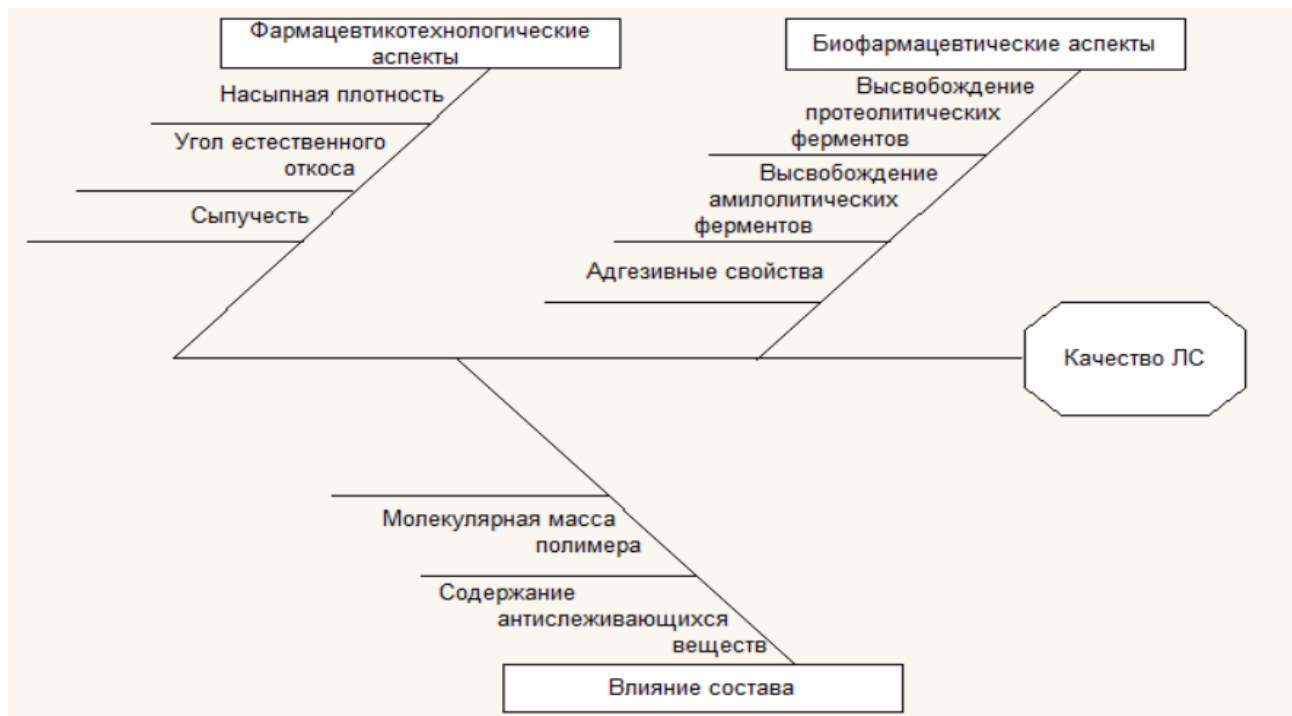


Рисунок 1.9 – Биофармацевтические и технологические аспекты, влияющие на качество лекарственной формы «Порошок»

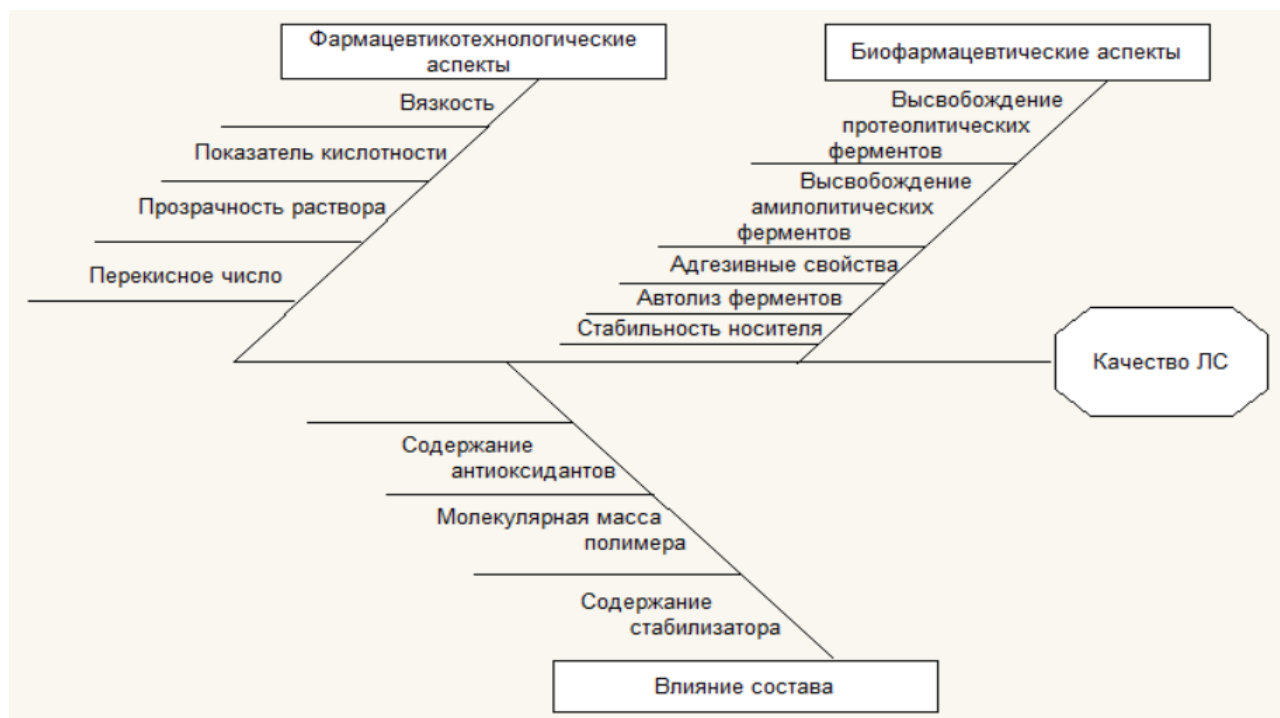


Рисунок 1.10 – Биофармацевтические и технологические аспекты, влияющие на качество лекарственной формы «Гель»

1.5. Применение многофакторного анализа для разработки лекарственных средств

Выбор пути разработки лекарственного средства должен основываться не на субъективном решении исследователя, а на научно-обоснованном подходе и статистическом анализе факторов системы взаимосвязанных с качеством ЛФ, основанием которого являются экспериментальные исследования. Однако многие ученые допускают упрощения системы, которые приводят к ошибкам в суждениях не подверженные статистическим анализом данных. Такие проблемы при разработке ЛС могут поставить в тупик даже опытных исследователей, ввиду отсутствия всестороннего рассмотрения проблемы при получении данных в ходе анализа.

Поэтому необходимо применение принципа QbD для анализа данных, полученных в ходе разработки [98]. Принцип QbD основан на применении многофакторного анализа для оптимизации процессов прогнозирования и выбора лекарственной формы. Прогнозирование возможно при наличии данных исследований других ЛС с принципиально отличающимися составами в разрезе одной ЛФ (например, различия в природе происхождения компонентов ЛФ).

Прогнозирование при помощи системы QbD начинается с выбора биофармацевтических и технологических аспектов, влияющих на качество разрабатываемого ЛС, взаимосвязь которых возможно описать при помощи диаграммы Исикавы. Выбор биофармацевтических и технологических аспектов основывается на литературных данных и накопленных результатов экспериментальных исследований. Уравнение применительно к диаграмме Исикавы прогнозирования аспектов ЛФ представлено ниже:

$$y = \sum X_1 + \sum X_2 + \sum X_3$$

где y – коэффициент отклика (качество ЛС), X_1 – факторы системы, отвечающие за биофармацевтический аспект разработки, X_2 – факторы системы, отвечающий за технологические аспекты разработки, X_3 – факторы системы, отвечающие за аспект разработки сформированный составом.

Любой многофакторный анализ сопряжен с системой уравнений, в которую входит множество переменных факторов, зависящих и не зависящих друг от друга. Главная задача исследователя выделить наиболее взаимосвязанные факторы, которые могут повлиять на качество разрабатываемого ЛС и отделить незначимые факторы анализа. Для определения взаимосвязи применяются методы математического анализа: корреляционный анализ, регрессионный анализ и дисперсионный анализ.

Вычисление силы взаимосвязи невозможно осуществить без определения наиболее зависящего фактора, входящего в систему уравнений для проведения математического анализа. При проведении корреляционной оценки знаки не показывают силу взаимосвязи, так как взаимосвязь выражается числом взятым по модулю. Обычно самыми зависимыми факторами

выбирают факторы, отвечающие за биофармацевтические аспекты фармацевтической разработки. Уравнение для оценки взаимосвязи при корреляционном анализе возможно представить следующим образом:

$$X_{1n} = \sum X_1 + \sum X_2 + \sum X_3$$

где X_{1n} – самый зависимый фактор системы, отвечающий за биофармацевтический аспект разработки, X_1 – факторы системы, отвечающие за биофармацевтический аспект разработки, X_2 – факторы системы, отвечающие за технологический аспект разработки, X_3 – факторы системы, отвечающие за аспект разработки сформированный составом.

После установления силы взаимосвязи факторов требуется осуществить выбор наиболее взаимосвязанных факторов с качеством ЛС. Так как сила взаимосвязи определяется количественно, выбираются числа наиболее близкие к максимальному значению. Определение факторов наиболее взаимосвязанных с качеством проводятся согласно диаграммы прогнозирования. После того как проведены предыдущие действия, система уравнений упрощается и содержит конечное число наиболее взаимосвязанных факторов. Примерное уравнение расчетов будет иметь вид:

$$y = X_1 + X_2 + X_3$$

где y – коэффициент отклика (качество ЛС), X_1 – факторы системы, отвечающие за биофармацевтический аспект разработки, X_2 – факторы системы, отвечающие за технологические аспекты разработки, X_3 – факторы системы, отвечающие за аспект разработки сформированный составом.

Для выполнения многофакторного анализа системы уравнения требуется закодировать величины в заданном диапазоне согласно одной из методик, примеры которых представлены в Таблице 1.2. Это требуется для обеспечения правильности проведения анализа, понимание диапазона применения количественной оценки методики определения для каждого фактора.

Существуют различные методики проведения многофакторного анализа. Но принцип построения функции почти одинаков: коэффициент отклика (y) формируются при помощи решения уравнения функции. Возможные методики проведения представлены в Таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Методики многофакторного анализа

Методика	Характеристика функции	Положительные стороны методики	Отрицательные стороны методики
Фактор подобия или различия	Линейная функция	– Факторы кодируются от 0 до 100	– Требуется референтный образец, – Сложность в критериях оценки, Отсутствие визуализации
Пространство проектных параметров	Может быть закодирована любая функция	– Позволят разделить многофакторный анализ по двум факторам системы – Хорошее разрешение, подходит для визуализации	– Требуется построение двух систем уравнений и одновременного решения обоих
Функция желательности Харингтона	Экспоненциальная функция	– Позволяет провести анализ сразу множества факторов	– Низкое разрешение суммарного фактора

Многофакторный анализ возможно проводить последовательно, применяя сразу несколько методик. Это позволяет добиться наилучшей визуализации.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

В ходе анализа литературных источников рассмотрены возможные биоразлагаемые полимеры и выбран наиболее оптимальный полимер для разработки ЛФ. В качестве оптимального биоразлагаемого носителя предлагается хитозан по причине физико-химических свойств, возможности модификации и низкой токсичности на организм.

Проведенный информационно аналитический поиск показал, что использование препаратов для местного применения обусловлено безопасностью, сочетанием местного и резорбтивного действия при обеспечении высокой концентрации действующих веществ в месте непосредственного воздействия и сокращением времени заживления ран.

В ходе анализа литературных источников рассмотрены возможные фармацевтические субстанции, которые возможно «встроить» в структуру молекулы хитозана и возможные лекарственные формы. В качестве активных компонентов были выбраны ферментативные ЛС.

Для решения поставленных задач по выбору оптимального состава лекарственного средства, соответствующая принципу QbD, необходимо разрабатывать многофакторные эксперименты

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В результате проведенного литературного обзора для дальнейшего изучения были выбраны действующие вещества на ферментативной основе, а с целью придания ЛС требуемых характеристик в качестве носителя в ЛФ был выбран биоразлагаемый полимер хитозана.

2.1.1. Действующие вещества

Для данного исследования были использованы действующие вещества, зарегистрированные на территории Российской Федерации в качестве лекарственных средств, с различной ферментативной активностью, которые способствуют заживлению ран: гиалуронидаза и химопсин.

Гиалуронидаза – лекарственный препарат, представляющей из себя фермент с α -амилолитической активностью выпускаемого в виде лиофилизата для внутреннего и наружного применения. Данные из спецификации на ЛС представлены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Данные из спецификации ЛС Гиалуронидаза

Наименование действующего вещества		Гиалуронидаза
Производитель (наименование производителя)		АО «НПО «Микроген»»
Номер серии (партии)		841119
Количество (масса, объем) партии (кг., шт., и т.д.)		10 уп № 10
Результаты внешнего осмотра		Удовлетворительные
Дата отбора поставки		13.12.19
№	Наименование показателей	Требования нормативной документации
1.	Описание	Порошок белого или светло-желтого цвета без запаха, гигроскопичный.
2.	Форма выпуска	Лиофилизат для приготовления раствора для местного и наружного применения
3.	Подлинность	Наличие амилолитической активности.
4.	Средняя масса	2 мг \pm 5 %
5.	Растворимость	Легко растворима в воде
6.	Микробиологическая чистота	Препарат должен выдерживать требования ГФ РФ XIV ОФС «Стерильность»
7.	Амилолитическая активность	На 1 ампулу препарата не более $1280 \pm 0,5$ ЕД
8.	Хранение:	При температуре не более 15 °С.
9.	Срок годности:	3 года

Химопсин – лекарственный препарат, представляющей из себя лекарственное средство, которое содержит в составе следующие протеолитические ферменты: трипсин и химотрипсин. Выпускается в виде лиофилизата наружного применения. Данные из спецификации на ЛС представлены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Данные из спецификации ЛС Химопсин

Наименование действующего вещества		Химопсин
Производитель (наименование производителя)		ООО «Самсон-Мед»
Номер серии (партии)		741219
Количество (масса, объем) партии (кг., шт., и т.д.)		10 уп № 10
Результаты внешнего осмотра		Удовлетворительные
Дата отбора поставки		19.12.19
№	Наименование показателей	Требования нормативной документации
1.	Описание	Кристаллический порошок белого цвета (Аморфная масса кремового цвета)
2.	Форма выпуска	Лиофилизат для приготовления раствора для местного и наружного применения
3.	Подлинность	Наличие протеолитической активности.
4.	Средняя масса таблеток	50 мг ± 5 %
5.	Растворимость	Легко растворима в воде
6.	Микробиологическая чистота	Препарат должен выдерживать требования ГФ РФ XIV ОФС «Стерильность»
7.	Протеолитическая активность	На 1 мг препарата не более $2 \pm 0,5$ ЕД
8.	Хранение	При температуре не более 20 °С.
9.	Срок годности	3 года

2.1.2. Вспомогательные вещества

Среди вспомогательных веществ были выбраны две группы: наполнители и антислеживающие вещества. Наполнителями выступали биоразлагаемые полимеры – полисахариды.

Биоразлагаемые полимеры (наполнители)

Хитозан – представляет собой линейный аминополисахарид, состоящий из мономера – 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкана. Хитозан является продуктом деацетилирования хитина в щелочной среде. Полученный после щелочного гидролиза хитозан, обладает различной степенью деацетилирования и молекулярной массой. В данном диссертационном исследовании был использован хитозан с молекулярной массой 200 и 500 кДа. Спецификации на хитозан представлены в Таблицах 2.3. и 2.4.

Таблица 2.3 – Спецификация хитозана пищевого молекулярной массой 200 кДа

Наименование вспомогательного вещества		Хитозан пищевой
Производитель (наименование производителя)		ООО «БИОПРОГРЕСС»
Номер серии (партии)		16
Количество (масса, объем) партии (кг., шт., и т.д.)		1 уп 1 кг
Результаты внешнего осмотра		Удовлетворительные
Дата отбора поставки		19.09.19
№	Показатель	Требования нормативной документации
1.	Описание	Аморфный порошок светло-кремового цвета
2.	Массовая доля влаги, %	7,68
3.	Массовая для минеральных веществ, %	0,57
4.	pH 1% раствора хитозана в 2% уксусной кислоте	3,5
5.	Массовая доля нерастворимых веществ, %	0,1
6.	Динамическая вязкость, сПз	162
7.	Сорбционная активность по ионам меди, мг/г	58,5
8.	Содержание основного вещества	89,7
9.	Хранение	При температуре 15-20 °С
10.	Срок годности	2 года

Таблица 2.4 – Спецификация хитозана пищевого молекулярной массой 500 кДа.

Наименование действующего вещества		Хитозан пищевой
Производитель (наименование производителя)		ООО «БИОПРОГРЕСС»
Номер серии (партии)		16
Количество (масса, объем) партии (кг., шт., и т.д.)		1 уп 1 кг
Результаты внешнего осмотра		Удовлетворительные
Дата отбора поставки		19.09.19
№	Показатель	Требования нормативной документации
1.	Описание	Аморфный порошок светло-кремового цвета
2.	Массовая доля влаги, %	7,68
3.	Массовая для минеральных веществ, %	0,57
4.	pH 1% раствора хитозана в 2% уксусной кислоте	3,5
5.	Массовая доля нерастворимых веществ, %	0,1
6.	Динамическая вязкость, сПз	162
7.	Сорбционная активность по ионам меди, мг/г	58,5
8.	Содержание основного вещества	89,7
9.	Хранение	При температуре 15-20 °С
10.	Срок годности	2 года

Антислеживающие вещества

Кремния диоксид коллоидный пирогенный (Аэросил) – форма диоксида кремния. В коллоидной форме применяется в медицине в качестве энтеросорбента (Асорб, Алесорб, Альфасорб, Новосорб, Полисорб, Сорбоксан) и для лечения наружно при гнойно-воспалительных заболеваниях мягких тканей (гнойные раны, флегмона, абсцесс, мастит).

По характеристике «описание» представляет собой рыхлый голубовато-белый порошок или в виде белой сажи - белый мелкодисперсный аморфный порошок или гранулы. Применяется в качестве скользящего, антислеживающего вещества. Спецификация представлена в Таблице 2.5. [8].

Таблица 2.5 – Спецификация кремния диоксида

Наименование действующего вещества		AEROSIL® 150
Производитель (наименование производителя)		Evonic Operations GmbH
Каталожный номер (CAS №)		7631-86-9
Количество (масса, объем) партии (кг., шт., и т.д.)		1 уп 10 кг
Результаты внешнего осмотра		Удовлетворительные
Дата отбора поставки		19.09.19
№	Наименование показателей	Показатели
	Описание	Порошок белого цвета
2.	Массовая доля влаги, %	1,47
3.	Удельная поверхность, м ² /г	151
4.	Средний размер частиц, нм	14
5.	Насыпная плотность, г/л	ca. 50
6.	Динамическая вязкость, сПз	162
7.	Потеря массы при высушивании, %	0,9
8.	pH (4% суспензия)	4,18
9.	Срок годности	3 года

2.2. Реактивы, использованные в процессе разработки и анализа лекарственного средства

Уксусная кислота ледяная (ХЧ) – уксусная кислота концентрации 99%, полученная путем вымораживания воды из раствора уксусной кислоты. Разбавленная уксусная кислота применялась для приготовления раствора хитозана, для проведения анализа и приготовления компонентов лекарственного средства.

Реактив Фолина – реактив для определения фенол-содержащих аминокислот, состоящий из смеси фосфорно-вольфрамовой H₃PW₁₂O₄₀ и фосфорно-молибденовой H₃PMo₁₂O₄₀ кислот, которая восстанавливается при окислении фенолов в смесь окислов вольфрама (W₈O₂₃) голубого цвета и молибдена (Mo₈O₂₃).

Таблица 2.6 – Реактивы, которые были использованы для разработки состава, качественного и количественного анализа ЛС

№	Название реактива	Содержание	Производитель, каталожный номер
1.	Аскорбиновая кислота	99,00%	ООО «Бадразвес»
2.	Гидроксид натрия	1 моль/л	Merck, 1091374000
3.	Йод кристаллический	99,50%	ООО "ПраймКемикалсгрупп", № 8135/2
3.	Казеин	81,90%	Murray Goulburn - MPC 85 Декларация соответствия TC RU Д-AU.АИ35.В.15839
4.	Калий йодистый	99,00%	АО "ЛенРеактив", ЧДА, ГОСТ 4232-74
5.	Кислота борная	98,60%	Panreac, 141015.0500ф
6.	Кислота ортофосфорная	85,00%	АО "ЛенРеактив", Ч, ГОСТ 6552-80
7.	Крахмал	95%	Sigma-Aldrich, S2004-1KG
8.	Уксусная кислота	0,1 моль/л	Merck, 1602501000
9.	Уксусная кислота ледяная	99,00%	Merck
10.	Натрий уксуснокислый 3-водный	99,00%	Sigma-Aldrich, S8625-500G
11.	Реактив Фолина	2 моль/л	Panreac, 251567.1609
12.	Соляная кислота	1 моль/л	Merck (Millipore, Sigma-Aldrich, Supelco), 1090575000
13.	Тирозин	99,00%	AppliChem, А-3401,0100ф
14.	Трихлоруксусная кислота	99,00%	Sigma-Aldrich, Т6399-250G
15.	Глицерин	85,00%	АО "ЛенРеактив", Ч, ГОСТ 6824-96

2.3. Планирование разработки лекарственного средства

Планирование эксперимента является одной из важных задач любого исследователя. При планировании эксперимента требуется детальное описание хода его исследования. В некоторых случаях эксперимент может затрудниться, из-за незначительных ошибок в предсказании результатов, поэтому дизайн эксперимента должен быть максимально гибким. Результаты планирования научно-исследовательской работы представлены на Рисунке 2.1.

Было решено разделить разработку на 6 этапов, которые будут отражать ход эксперимента научно-исследовательской работы. На подготовительном этапе, были установлены направления экспериментальной работы, материалы и методы, с помощью которых проводилась разработка и контроль качества разрабатываемого ЛС.

Второй этап включал все экспериментальные исследования, которые были выполнены для разработки составов ЛС, разработку методик анализа, оценку технологических характеристик составов и количественного определения активных компонентов. Третий этап включал

обоснование выбора состава ЛС с помощью математических методов исследования, которые включали корреляционный анализ, метод построения диаграммы «причина – следствие» и дисперсионного анализа, и многофакторного анализа результатов на основе функции желательности Харрингтона. Четвертый этап состоял из разработки технологии получения ЛС и выбор критериев анализа. Пятый этап состоял из исследования стабильности и сроков годности ЛС на основе критериев, которые были выбраны на предыдущих этапах. Шестой этап необходим был для разработки НД для анализа оценки качества ЛС, включающий разработку проекта спецификации на ЛС.

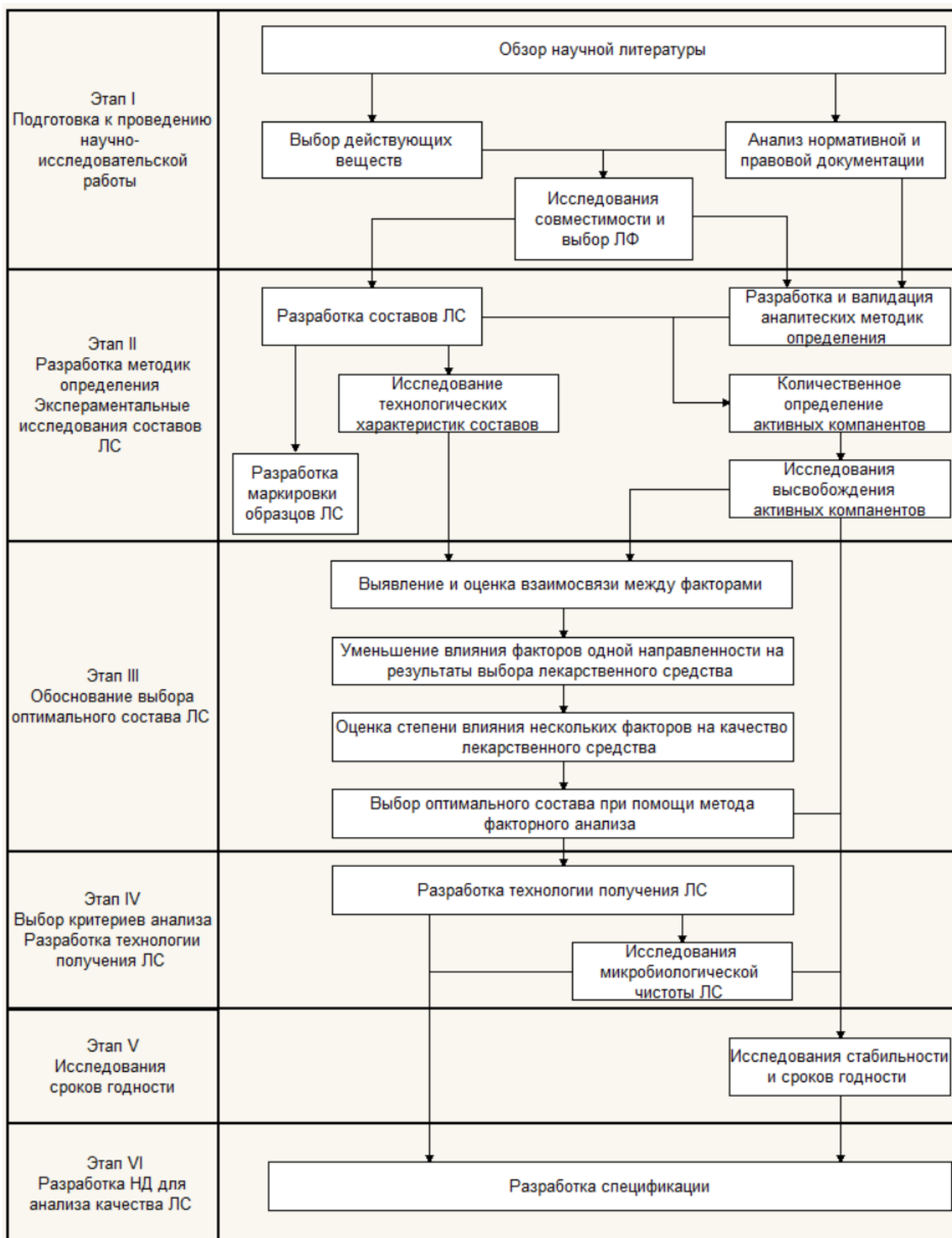


Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

2.4. Экспериментальные методы исследования разрабатываемых составов лекарственного средства

Определение динамической вязкости. Исследование динамической вязкости проводилось на вибрационном вискозиметре фирмы A&D SV-10 при стандартных лабораторных условиях. Определение динамической вязкости осуществлялось согласно формуле 2.1.

$$\eta = \frac{\tau}{D}$$

где η – динамическая вязкость, τ – напряжение сдвига, D – скорость сдвига

Потенциометрическое определение показателя рН. Потенциометрическое определение показателя рН проводилось согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.19.0002.15 «Потенциометрическое титрование» высокоомным рН-метром фирмы Mettler Toledo Seven Compact S220 при стандартных лабораторных условиях [10, 23].

Органолептическая оценка прозрачности раствора. Органолептическая оценка прозрачности раствора устанавливали согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей» визуальным органолептическим методом на белом фоне с использованием в качестве эталонной жидкости соответствующий стандартный раствор [10, 23].

Органолептическая оценка прозрачности раствора. Органолептическая оценка прозрачности раствора устанавливали согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей» визуальным органолептическим методом на белом фоне с использованием в качестве эталонной жидкости соответствующий стандартный раствор [10, 23].

Метод сублимационной сушки. Для выбора оптимальных условий, а также разработки технологии получения носителя был использован метод сублимационной сушки согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.4.1.0031.18 «Лиофилизаты» [10, 23]. Сублимационная сушка проводилась в условиях вакуума на аппарате Martin Christ Beta 2-8 LSCplus

Определение влажности. Определение показателя влажность проводили согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» на анализаторе влажности фирмы Mettler Toledo HE73 [10, 23].

Микроскопия образцов. Показатель микроскопия определяли согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.0009.15 «Оптическая микроскопия» [10]. на оптическом микроскопе Микромед-1 (Китай), на который через специальный штатив-адаптер была установлена камера фирмы toucam разрешением 5.1 мегапиксель.

Ситовой анализ образцов. Ситовой анализ проводили согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ» при помощи лабораторную систему просеивания Cisa с различными ситами до 180 мкм [10, 23].

Насыпная плотность, сыпучесть и угол естественного откоса. Насыпная плотность, сыпучесть и угол естественного откоса определяли согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.4.2.0016.15

«Степень сыпучести порошков». При определении использовали предварительно взвешенный мерный цилиндр объемом 100 мл. Составы порошков насыпались через воронку объем, которых составлял 100 мл. Результаты исследований представлены в Таблице 3.11. и на гистограмме, представленной на Рисунке 3.4. Мерный цилиндр взвешивался, и затем вычиталась масса цилиндра. Насыпную плотность рассчитывали согласно формуле:

$$V_m = \frac{m}{V}$$

где V_m – это насыпная плотность, мг/мл; m – масса образца порошка, мг; V – объем занимаемый образцом порошка, мл.

Насыпную плотность после уплотнения определяли на приборе для определения насыпного объема при использовании программы на 1250 подскоков. Насыпную плотность после уплотнения для образцов порошка согласно формуле 3.1. Определение коэффициента прессируемости проводили согласно формуле, согласно ГФ РФ XIV [10]:

$$K_p = \frac{V_0 - V_1}{V_0} \times 100$$

где K_p – коэффициент прессируемости, %; V_0 – начальный объем заполнения цилиндра образцом ЛС, мл; V_1 – конечный объем заполнения цилиндра образцом ЛС после проведения анализа, мл.

Насыпная плотность определялась при помощи тестера насыпной плотности Electrolab D-1020 (Индия). Сыпучесть и угол естественного откоса определялась при помощи воронки Electrolab EFT-01 с использованием насадки 1 с диаметром отверстия $10 \pm 0,01$ мм.

Определение параметров сыпучесть и угол естественного откоса проводили согласно общей методики определения сыпучести порошков, взятой из ГФ РФ XIV ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» [10].

Определение показателя сыпучести материалов (скорость протекания образцов порошка) через стандартизированное отверстие насадки 1 с диаметром отверстия $10 \pm 0,01$ мм. Методика определения данного показателя соответствует ГФ РФ [10]. Определение скорость протекания образцов порошка:

$$v_c = \frac{m}{t}$$

где v_c – скорость протекания образцов порошков ЛС через отверстие воронку, г/с; m – масса образцов порошков ЛС взятого на анализ, г; t – время, за которое весь образец порошка ЛС проходит через воронку, с.

Определение показателя «Угол естественного откоса» проводили при помощи того же оборудования, что и показателя «Скорость протекания образцов порошка» при тех же условиях. Результаты исследования представлены в Таблице 3.12. и 3.13. Результат степень сыпучести (k_c) устанавливали согласно ГФ РФ XIV и Фармакопее ЕАЭС [10, 23]. Измерение угла естественного откоса проводили при помощи линейки с ценой деления 1 мм по параметрам «конуса порошка» согласно формуле:

$$k_{\alpha} = \operatorname{arctg} \frac{2h}{D}$$

где k_{α} – угол естественного откоса образцов порошка ЛС; h – высота «конуса порошка» образцов порошка ЛС, мм; D – диаметр «конуса порошка» образцов порошка ЛС, мм.

Разработка аналитических методик определения компонентов лекарственного средства. Для разработки аналитических методик были использованы соответствующая нормативная документация: ГФ РФ XIV, ГОСТ и Решения ЕЭК [4, 7, 10, 22, 23, 25, 111, 113, 114, 115, 116].

Методики проведения контроля качества ЛС по характеристике количественное определение проводили согласно ГОСТ [4, 7] на основе метода спектрофотометрии в УФ и видимой областях, проведение которой регламентируется ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях» [10].

В качестве основного метода для изучения протеолитической активности фермента была взята методика определения белка согласно ГОСТ 20264.2-88 «Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности (с Изменением №1)» [7]. Методика ГОСТ [7] основана на определении свободных аминокислот, полученных путем расщепления пептидных связей в молекуле казеината натрия, спектрофотометрическим методом по значениям оптической плотности, после проведения реакции с реактивом Фолина.

Метод проведения контроля качества по характеристике определение амилолитической активности была основана на методике ГОСТ 54330-2011 «Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилолитической активности» [4]. Методика ГОСТ [4] основана на количественном определении прогидролизованного крахмала в результате гидролиза ферментами амилолитического ряда до декстринов различной молекулярной массы в стандартных условиях с спектрофотометрической регистрацией по значениям оптической плотности.

Все разработанные методики были валидированы согласно требованиям ГФ РФ XIV ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» и Решению ЕАЭК от 17 июля 2018 г. N 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств» [10, 25].

Растворение для твердых дозированных лекарственных форм. Для определения высвобождения ферментативной ФС из ЛФ было решено провести тест растворение для разрабатываемого ЛС. Определение параметра высвобождения было проведено согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» на приборе фирмы Electrolab модели EL-1 8S с насадкой по типу «вращающаяся корзинка» с определением высвобождения ФС согласно разработанным аналитическим методикам количественного определения [10]. Условия проведения анализа высвобождения протеолитического фермента представлены в Таблице 2.7.

Таблица 2.7 – Условия проведения ТСКР для протеолитического и амилолитического фермента

Характеристика	Значения
Тип аппарата:	Вращающаяся корзинка;
Среда растворения, субстрат	Казеинат натрия Казеинат натрия/крахмал (1:1)
Объем среды растворения, мл	500
Скорость вращения, об/мин	45
Время отбора проб, мин	10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 150; 180; 210; 240; 270
Температура среды растворения, °С	37 ± 0,5 °С
Объем пробы, мл	10 мл.

Определения показателей микробиологической чистоты. Определение показателей микробиологической чистоты проводилось по ГФ РФ XIV ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» и ОФС.1.4.1.0010.15 «Порошки» [10]. Так как, согласно ОФС.1.4.1.0010.15 «Порошки» требуется, чтобы ЛС для наружного применения было стерильно, было решено проводить исследования согласно ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» [10]. Исследования микробиологической чистоты были гармонизированы с Фармакопеей ЕАЭС, утвержденной решением ЕЭК № 100 от 11.08.2020 г [23].

Определение показателя стабильности и сроков годности лекарственного средства. Определение показателя стабильности в процессе хранения является одним из важнейших параметров качества ЛС, при помощи которого возможно произвести определение сроков годности и получить данные о влиянии упаковки и ее элементов на качество ЛС. Определение показателя стабильность согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» можно осуществить при помощи двух принципиально различных методов: долгосрочное испытание стабильности, которое проводят в условиях хранения препарата, и ускоренного старения ЛС, которое проводится при повышенных температурах и влажности. Однако метод ускоренного старения не подходит для проведения стабильности ферментативных лекарственных средств, поэтому было решено проводить исследования

показателя стабильности при помощи метода долгосрочного испытания стабильности для разрабатываемого ЛС [10, 23].

2.5. Математические методы исследования для осуществления выбора оптимального состава лекарственного средства

При применении QbD для осуществления выбора оптимального состава разрабатываемого ЛС требуется применение многофакторного анализа и соответствующих методов математического анализа.

Поэтому для обоснования выбора оптимального состава разрабатываемого ЛС было решено последовательно применить несколько математических методов исследования, таких как корреляционный анализ, метод построения диаграммы Исикавы, метод дисперсионного анализа и метод многофакторного анализа на основе функции желательности Харрингтона для осуществления выбора оптимального состава ЛС.

2.5.1. Корреляционный анализ

Для оценки взаимосвязи между технологическими и биофармацевтическими факторами был использован математический метод корреляционного анализа [47]. Оценка проводилась при помощи числовых характеристик системы называемой корреляционным моментом взаимосвязи, которая рассчитывалась по формуле:

$$K_{xy} = M[(X - m_x)(Y - m_y)]$$

где K_{xy} – корреляционный момент взаимосвязи, X и Y – случайные величины для каждого фактора, m_x – математическое ожидание для фактора X , m_y – математическое ожидание для фактора Y .

Для интерпретации результатов при построении корреляционной матрицы для оценки корреляционного момента использовали коэффициент корреляции (r_{xy}) [47, 134]. Формула расчета имеет следующий вид.

$$r_{xy} = \frac{K_{xy}}{\sigma_x \sigma_y}$$

где σ_x и σ_y – среднеквадратичное отклонение факторов X и Y соответственно, r_{xy} – коэффициент корреляции факторов X и Y , K_{xy} – корреляционный момент взаимосвязи

Поскольку деление на средние квадратические отклонения составляющих системы представляет собой операцию нормирования исходной величины – корреляционного момента, иногда коэффициент корреляции называют нормированным.

Корреляционная связь между случайными величинами устанавливается по результатам наблюдений и характеризуется коэффициентом корреляции, который в математической статистике вычисляется по формуле:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

где r_{xy} – коэффициент корреляции для факторов X и Y; \bar{x} и \bar{y} – среднее арифметическое значения для факторов X и Y.

Полученные величины в результате расчета коэффициента корреляции безразмерны и расположены в диапазоне от -1 до +1. Для оценки тесноты взаимосвязи использовалась шкала Чеддока, представленная на Рисунке 2.2.

Корреляционный анализ проводился при помощи специализированного ПО на основе Microsoft Excel. Полученные результаты были оценены при дальнейшей дифференциации факторов.

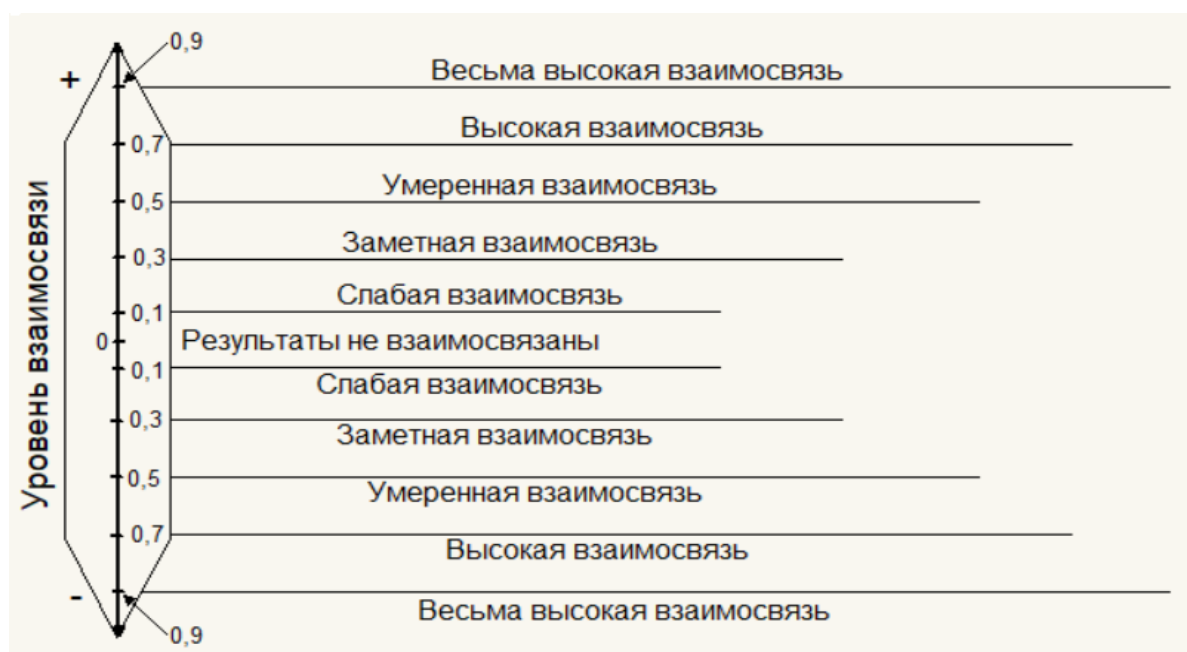


Рисунок 2.2 – Интерпретация результатов коэффициента корреляции на основе шкалы Чеддока

2.5.2. Метод построения диаграммы Исикавы

Диаграмма Исикавы — это графический способ исследования и определения наиболее существенных причинно-следственных взаимосвязей между факторами и последствиями в исследуемой ситуации или проблеме [95]. Диаграмма Исикавы является универсальным методом визуальной интерпретации разделения на группы факторов влияющих на основополагающий фактор [47, 61]. Пример построения диаграммы Исикавы представлен на Рисунке 2.3. Для построения диаграммы Исикавы придерживались следующих принципов:

- требовалось сформулировать проблему, так называемую «голову рыбы», которую требуется записать во главе горизонтальных прямых, так называемого «хребта рыбы»;
- требовалось сформулировать наиболее существенные факторы, влияющие на проблемы, и нанести их на «большие кости»;
- требовалось выяснить причины (экспериментальные факторы), влияющие на исход проблемы и нанести их на «малые кости»;
- требовалось ранжирование факторов по значимости и формулирование гипотез о взаимосвязях причин.

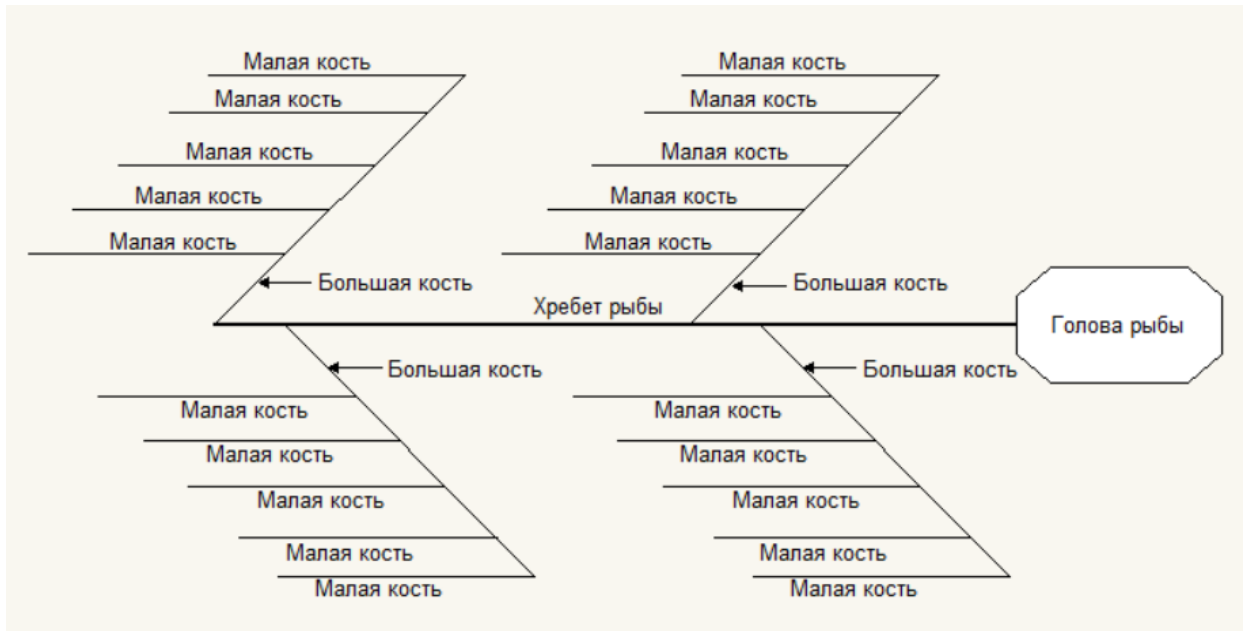


Рисунок 2.3 – Пример построения диаграммы Исикавы

2.5.3. Метод дисперсионного анализа

Дисперсионный анализ – метод математического статистического анализа, предназначенный для моделирования влияния входных факторов, уровни которых, как правило, оцениваются качественно, по номинальной шкале. Выходным параметром являлся отклик функции [47, 134].

Для оценки использовались несколько выходных параметров. Такими параметрами являются критерий Фишера и уровень значимости p , критерии которых описаны в главе 3 в разделе 3.4.3. По результатам проведенного анализа оценивали допустимо ли устанавливать зависимость факторов между собой, а также степень различности полученных данных. Дисперсионный анализ проводился при помощи специализированного ПО на основе Microsoft Excel.

2.5.4. Метод многофакторного анализа на основе функции желательности Харрингтона

Для проведения многофакторного анализа была использована экспоненциальная кривая – так называемая «кривая желательности Харрингтона» [87]. Математический аппарат расчетов состоял из нескольких принципов:

- первоначально экспериментальные данные должны быть закодированы, чтобы обеспечить однозначность результатов многофакторного анализа
- далее полученные результаты перевода подставляются в функцию для осуществления получения отклика системы. Функция представлена ниже:

$$d = e^{-e^{-y}}$$

где d – коэффициент расчета для факторов, y – кодированная величина

- полученные результаты отклика системы должны быть закодированы в значениях от 0 до 1, однако для однозначности при визуализации полученных результатов требуется чтобы результаты были закодированы в промежутке от 0,2 до 0,63, при данных значениях функция имеет линейную форму.

– полученные результаты отклика суммируются при помощи формулы представленной в главе 3 разделе 3.4.4. Выбор оптимального состава при помощи метода факторного анализа. Многофакторный анализ проводился при помощи специализированного ПО на основе Microsoft Excel.

2.5.5. Метод многофакторного анализа на основе пространства проектных параметров

Для проведения визуализации результатов многофакторного анализа был использован метод построения пространства проектных параметров [48] иными словами «рабочего окна разработки» на основе данных, полученных после проведения многофакторного анализа при помощи функции желательности Харрингтона. Математический аппарат построения пространства проектных параметров состоял в построении трехмерного графика согласно выбранной функции. Уравнение функции, которое легло в основу определения пространства проектных параметров представлено функцией желательности Харрингтона. Уравнение функции для построения пространства проектных параметров представлена в уравнении функции:

$$e^{-y} = \sqrt{d_1 \times d_2}$$

где y – отклик функции, d_1 – факторы начального момента времени, d_2 – факторы конечного момента времени.

Для определения «лучшего» состава требуется отражение нескольких принципов для осуществления анализа диктуемым уравнением функции:

- результат суммирования анализируемых факторов должен стремиться к 1 или находится ближе к 1;
- если результаты находятся на одном уровне по характеристике то выбирается тот отклик, который находится ближе к середине пространства проектных параметров

ГЛАВА 3. ФАРМАЦЕВТИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

3.1. Обоснование выбора лекарственной формы на основе параметров фармацевтической композиции

Первоначальной задачей разработки лекарственных средств является оценка физико-химических свойств и технологических параметров действующих и вспомогательных веществ, а также факторов, оказывающих на них влияния. Адекватное соотношение свойств, параметров и факторов формирует пространство «рабочего окна разработки» для выбора оптимальной ЛФ и ее состава.

3.1.1. Определение состава действующих веществ лекарственного средства

Состав действующих веществ лекарственного средства должен представлять собой ферментативный комплекс с различной направленностью действия, для оказания положительного влияния на скорость очищения и заживления раны. Достичь такого влияния возможно с использованием в качестве ЛС ферментативных комплексов с амилолитической и протеолитической активностью.

Среди ферментативных комплексов амилолитического характера был произведен выбор в пользу фермента гиалуронидазы, обладающей α -амилолитической активностью. Данный ферментативный комплекс расщепляет полисахариды, входящие в состав экссудата и соединительной ткани, главным компонентом которого является гиалурановая кислота [109]. Также гиалуронидаза обладает другими положительными свойствами: уменьшает вязкость соединительной ткани, облегчает движение жидкостей в межклеточном пространстве, а также способствует уменьшению отечности тканей [11].

Среди ферментативных комплексов протеолитического характера был произведен выбор в пользу ферментативного лекарственного средства химопсина, состоящего из двух ферментов с протеолитической активностью: трипсина и химотрипсина. Данный ферментативный комплекс расщепляет белковые и пептидные молекулярные структуры, что вызывает снижение вязкости экссудата и выведению его из раны [11].

3.1.2. Определение количественного состава действующих веществ лекарственного средства

Разрабатываемое ЛС на основе биоразлаемых ферментов для эффективного и безопасного применения должно содержать определенные количества протеолитических и амилолитических ферментов согласно инструкции по применению ЛС каждого наименования.

Определение количественного состава активных компонентов ЛС проводилось согласно показаниям по применению ферментативных ЛС. Так, применение ЛС ферментативного характера рассчитывалось исходя из активности на 1 см² поверхности [11]. Данные по дозировкам выбранных ЛС ферментативного характера представлены в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Эффективное количество, которое требуется для разового наружного применения согласно инструкции на ЛС

№	Лекарственное средство	Доза на 1 см ² , МЕ	Доза, мг
1	Гиалуронидаза	640	1
2	Химопсин	20	10

Таким образом, содержание ферментов в одной дозе разрабатываемого ЛС должно составлять 1 и 10 мг для гиалуронидазы и химопсина соответственно.

3.2. Выбор вспомогательного вещества в качестве носителя лекарственной формы и его получение

В качестве носителя, разрабатываемого ЛС, был выбран хитозан, из-за благоприятных биологических свойств и безопасности его применения. Однако хитозан это не растворимое в воде соединение, которое нужно модифицировать в водорастворимую ионизированную форму, не утратив безопасность разрабатываемого ЛС на его основе. Среди множества органических кислот, которые могут выступить в качестве растворителя хитозана, были выбраны аскорбиновая и уксусная кислоты.

В фармацевтической практике по созданию солевых форм хитозана в качестве как вспомогательного, так и действующего вещества чаще всего используется растворы уксусной кислоты. Это связано с тем, что ацетатная форма хитозана обладает достаточной устойчивостью [34].

Исследования по использованию продукта реакции хитозана с уксусной кислотой – ацетата хитозана широко освещены в ряде работ [17, 85, 96, 132]. Однако стандартизация по показателю «количественное содержание» уксусной кислоты в ацетате хитозана осложняется тем, что в процессе производства и хранения растворимой модификации хитозана часть кислоты

улетучивается или переходит в несвязанное состояние. По этим причинам ее содержание изменяется с течением времени.

Среди множества органических кислот, которые также могут выступать в качестве растворителя хитозана, перспективно использовать аскорбиновую кислоту [77]. Значение рКа аскорбиновой кислоты наиболее близкое к уксусной кислоте, что определяет возможность ее применения в целях получения солевых форм хитозана – его растворимых модификаций.

В отличие от использования уксусной кислоты в процессе получения солевых форм хитозана применение аскорбиновой кислоты будет более безопасным в виду минимальных токсических влияний на организм человека [86]. Отсутствие летучих свойств у аскорбиновой кислоты способствует возможности более точной стандартизации ее количественного содержания в солевой форме хитозана. Более того, аскорбиновая кислота оказывает благоприятное воздействие на поврежденные ткани [127].

3.2.1. Определение верхнего предела кислотности среды для растворения носителя

Для определения эквивалента кислоты проводилось растворение хитозана 200 и 500 кДа в растворе уксусной и аскорбиновых кислот. Данные представлены в Таблице 3.4 и 3.5. Помимо визуального органолептического анализа полученных растворов также проводилось определения вязкости и потенциометрическое определение рН полученных растворов. Для растворения использовались заранее приготовленные растворы кислот, которые потом разбавлялись.

Подготовка к анализу: Значение концентрации стандартных растворов аскорбиновой и уксусной кислоты составляла 20%. Приготовление стандартного раствора аскорбиновой кислоты с массовой долей 20%: точную навеску аскорбиновой кислоты, содержащую 200 г вещества помещали в мерную колбу объемом 1000 мл, доводили до метки дистиллированной водой. Проводили растворение аскорбиновой кислоты. Данный раствор использовать свежеприготовленным.

Приготовление стандартного раствора уксусной кислоты с объемной долей 20%: ледяную уксусную кислоту объемом 20 мл аккуратно переносили в наполовину наполненную дистиллированной водой мерную колбу, полученный раствор доводили до метки дистиллированной водой.

Получение водорастворимого хитозана: Точную навеску хитозана, содержащую 4,00 г вещества, переносили в химический стакан на 100 мл, приливали требуемый объем раствора уксусной или аскорбиновой кислоты и оставляли перемешиваться на верхнеприводной мешалке на высокой скорости в течение 30 с. Затем к полученной массе добавляли требуемый объем дистиллированной воды. Перемешивали в течение 2 часов. Объем приготовленных растворов

составил 100 мл. Требуемые объемы и схема приготовлений растворов водорастворимого хитозана с молекулярными массами 200 и 500 кДа представлена в Таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Схема приготовлений растворов водорастворимого хитозана

№ Раствора	Навеска хитозана, г	Объем раствора, мл	Объем стандартного раствора кислоты, мл	Объем дистиллированной воды, мл	Полученная концентрация кислоты, %
<i>Раствор аскорбиновой кислоты</i>					
1	4,00	100,00	50,00	50,00	10
2	4,00	100,00	40,00	60,00	8
3	4,00	100,00	30,00	70,00	6
4	4,00	100,00	20,00	80,00	4
5	4,00	100,00	15,00	85,00	3
6	4,00	100,00	10,00	90,00	2
7	4,00	100,00	5,00	95,00	1
<i>Раствор уксусной кислоты</i>					
8	4,00	100,00	50,00	50,00	10
9	4,00	100,00	40,00	60,00	8
10	4,00	100,00	30,00	70,00	6
11	4,00	100,00	20,00	80,00	4
12	4,00	100,00	15,00	85,00	3
13	4,00	100,00	10,00	90,00	2
14	4,00	100,00	5,00	95,00	1

Полученные растворы оценивали согласно ГФ РФ XIV по показателю «Прозрачность и степень мутности жидкостей» визуальным органолептическим методом на белом фоне с использованием в качестве эталонной жидкости соответствующего стандартного раствора. Также осуществляли определение значений рН растворов для установления верхнего предела кислотности среды растворения хитозана [10].

Процесс растворения хитозана и его модификация в солевую форму сопровождался повышением показателя динамической вязкости раствора. Следует отметить, что значение динамической вязкости раствора оказывает существенное влияние на технологические параметры сублимационной сушки, поэтому проводили оценку данного показателя [137]. Если в растворе наблюдались не растворившиеся частички хитозана, его называли «суспензионным» – для этих растворов анализ вязкости и потенциметрическое определение показателя рН не проводились [10].

Согласно представленным результатам исследований, приведенными в Таблице 3.3. и 3.4., наблюдается логарифмическая зависимость данных: при уменьшении концентрации кислоты в растворе хитозана наблюдается увеличение значений параметра вязкости растворов, а также сдвиг значений показателя рН в сторону слабокислой среды. Это связано с конечной растворимостью хитозана, называемой кривой насыщения раствора. Результаты определения

коэффициента корреляции для растворов, содержащих хитозан с молекулярной массой 200 кДа, представлены на Рисунке 3.1.

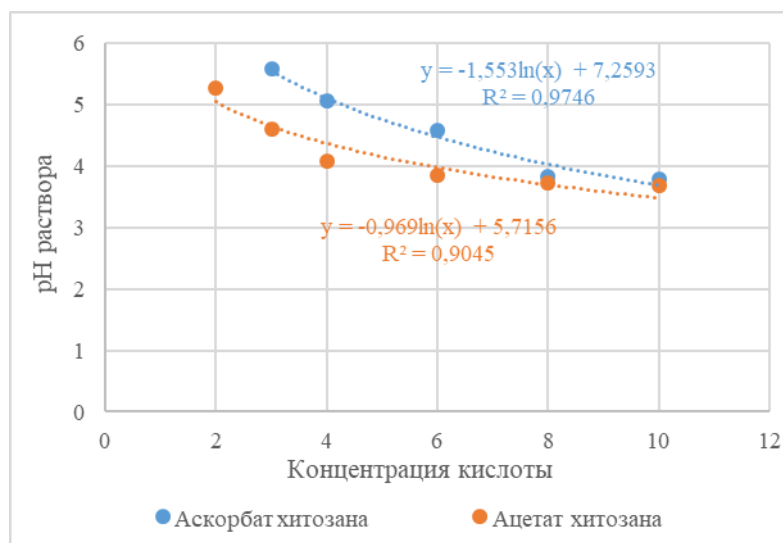


Рисунок 3.1 – Результаты определения величины аппроксимации

Таблица 3.3 – Результаты определения верхнего предела кислотности среды для растворения хитозана с молекулярной массой 200 кДа

№	Аскорбат хитозана			№	Ацетат хитозана		
	Вязкость, мПа×с	pH	Наблюдения		Вязкость, мПа×с	pH	Наблюдения
1	628,0	3,79	Прозрачный раствор	8	756,0	3,68	Прозрачный раствор
2	649,0	3,84	Прозрачный раствор	9	521,0	3,72	Прозрачный раствор
3	700,0	4,58	Прозрачный раствор	10	897,0	3,86	Прозрачный раствор
4	760,0	5,06	Прозрачный раствор	11	1023,0	4,09	Прозрачный раствор
5	1000,0	5,58	Прозрачный раствор	12	1287,0	4,61	Прозрачный раствор
6	-	-	Суспензионный раствор	13	1507,0	5,27	Прозрачный раствор
7	-	-	Суспензионный раствор	14	-	-	Суспензионный раствор

Результаты исследования верхнего предела кислотности среды, при которой получались прозрачные растворы хитозана, представленные в Таблицах 3.3. и 3.4, были подвергнуты перерасчету. Так, было установлено, что для образования солевой формы, полученной путем растворения 1,00 г хитозана с молекулярной массой 200 кДа, необходимо использовать аскорбиновую кислоту концентрации 0,75 %, для получения 100 мл раствора, приготовленного согласно методике, а концентрация уксусной кислоты должна составлять 0,5 % на 100 мл раствора, для получения 100 мл раствора, приготовленного согласно методике.

Таблица 3.4 – Результаты определения верхнего предела кислотности среды для растворения хитозана с молекулярной массой 500 кДа

Аскорбат хитозана				Ацетат хитозана			
№	Вязкость	pH	Наблюдения	№	Вязкость	pH	Наблюдения
1	675,0	3,63	Прозрачный раствор	8	708,0	3,71	Прозрачный раствор
2	867,0	3,74	Прозрачный раствор	9	745,0	3,86	Прозрачный раствор
3	1303,0	4,05	Прозрачный раствор	10	1324,0	3,98	Прозрачный раствор
4	1454,0	4,99	Прозрачный раствор	11	1357,0	4,23	Прозрачный раствор
5	-	-	Суспензионный раствор	12	1471,0	4,81	Прозрачный раствор
6	-	-	Суспензионный раствор	13	-	-	Суспензионный раствор
7	-	-	Суспензионный раствор	14	-	-	Суспензионный раствор

Для образования солевой формы, полученной путем растворения 1,00 г хитозана с молекулярной массой 500 кДа, необходимо использовать аскорбиновую кислоту концентрации 1 %, для получения 100 мл раствора, приготовленного согласно методике, а концентрация уксусной кислоты должна составлять 0,75 % на 100 мл раствора, для получения 100 мл раствора, приготовленного согласно методике.

Следует отметить, что результаты полученных исследований по определению эквивалентного количества кислоты, свидетельствуют об удовлетворительном использовании хитозана как с молекулярной массой 200 кДа, так и 500 кДа в разработке носителя на основе биоразлагаемого полимера.

Водорастворимый биodeградируемый полимер ацетат хитозана по органолептическим свойствам обладал запахом уксусной кислоты, что свидетельствовало о том, что часть уксусной кислоты находится в свободном (несвязанном) состоянии. Следует отметить, что содержание свободной кислоты может привести к нежелательным влияниям на живой организм. Поэтому в качестве растворимой модификации хитозана был выбран аскорбат хитозана. Раствор биodeградируемого полимера аскорбата хитозана имел более близкие значения pH к раневому экссудату [34], что также подтверждает выбор его растворимой формы в качестве носителя фармацевтической субстанции для дальнейшей разработки состава лекарственной формы.

Таким образом, оптимальными для дальнейшей разработки биodeградируемого носителя были выбраны раствор под №3 для аскорбата хитозана 200 кДа и раствор под №4 для аскорбата хитозана 500 кДа.

3.2.2. Исследование влияния амилолитического фермента на гидролиз структуры аскорбата хитозана

Группа амилолитических ферментов – это ферменты, расщепляющие связи в полисахаридах. Хитозан по своей химической структуре является β -аминополисахаридом, поэтому требуется оценить влияние фермента на структуру хитозана. Оценка влияния производилась на основе свойства изменения вязкости от молекулярной массы полимера на 3 образцах.

Подготовка к исследованию и проведение анализа: для проведения исследования возможности гидролиза структуры хитозана амилолитическим ферментов использовали раствор №3 аскорбата хитозана 200 содержащего 3 % аскорбиновой кислоты и раствор №4 аскорбата хитозана 500 содержащего 4 % аскорбиновой кислоты, приготовленного согласно методике приготовления раствора хитозана (раздел 3.2.1)

Фермент вводили в раствор при помощи дистиллированной воды, в раствор сравнения вводили аликвоту воды. Аликвота раствора фермента содержала в пересчете на активность фермента 1280 МЕ. Маркировка раствора, содержащего фермент получила кодировку «Ф». Образцы подвергались термостатированию при 20 °С в течение 1 часа. Результаты исследования динамической вязкости и анализ результатов исследования представлены в Таблице 3.5.

Для определения сходимости значений была проведена оценка выборки средних значений на однородность. Для этого, для результатов испытаний, полученных для каждого раствора, была вычислена средневзвешенная дисперсия и критерий Стьюдента.

Таблица 3.5 – Результаты исследования динамической вязкости и анализ результатов исследования «Возможность гидролиза структуры хитозана»

№	X_i	\bar{A}	S^2_x	$\sum d_i^2$	CO	S_r	RSD, %	t
3	628,0	630,00	147,00	8,6667	12,1244	0,019245	1,9245	0,3828
	643,0							
	619,0							
3Ф	634,0	632,67	82,33	6,4444	9,07377	0,01434	1,4342	
	641,0							
	623,0							
4	671,0	672,67	212,33	10,2222	14,57166	0,02166	2,1663	0,5511
	659,0							
	688,0							
4Ф	665,0	664,00	43,00	4,6667	6,5574	0,0099	0,9876	
	670,0							
	657,0							

Примечания: X_i – результаты измерения, \bar{A} – средние значение абсорбции, S^2_x – дисперсия; $\sum d_i^2$ – среднеквадратичное отклонение, CO – стандартное отклонение, S_r – относительное стандартное отклонение RSD – относительное стандартное отклонение, %, t – критерий Стьюдента, Ф – образец содержащий фермент

Все вычисленные значения не превышают Табличного значения ($t_{0,95;6} = 2,5705$). Следовательно, между средним арифметическим значением результатов испытаний для растворов нет значимых различий.

Таким образом в результате проведения исследования «Возможность гидролиза структуры хитозана» было доказано, что введение в раствор аскорбата хитозана амилолитического фермента не оказывает влияния на молекулярную структуру хитозана.

3.2.3. Выбор лекарственной формы лекарственного средства

Выбор лекарственной формы должен основываться на физико-химических и технологических свойствах активных и вспомогательных веществ. Разработанное ЛС должно обладать эффективностью и стабильностью при хранении, следовательно, требуется исключить негативное влияние факторов на эффективность и стабильность разработанного ЛС. Одним из таких факторов для протеолитических ферментов является автолиз в жидкой среде [143], что подразумевает нерациональность разработки такого вида лекарственной формы.

Из-за того, что в составе разрабатываемого ЛС содержатся протеолитические ферменты трипсин и химотрипсин, которые обладают свойством автолиза при введении в жидкую среду при отсутствии субстрата для ферментации, было решено выбрать получение твердой ЛФ.

С целью исключения автолиза было решено вводить ферменты после сушки аскорбата хитозана, а для однородности смешивания активных и вспомогательных веществ было решено измельчить твердую форму аскорбата хитозана, таким образом, получив порошок, в качестве ЛФ.

3.2.4. Разработка способа получения твердой формы аскорбата хитозана

На основании данных литературного обзора для получения твердой формы аскорбата хитозана содержащей минимальное количество влаги требуется применение метода сублимационной сушки. Необходимо определение времени воздействия сушки на препарат, зависящий от объема растворителей, использующихся в процессе получения раствора, и получение твердой формы с наименьшим количеством влаги для предотвращения автолиза. Так как хитозан термостабильное соединение, оно может быть подвергнуто длительной заморозке при очень низких значениях температур [119, 137].

Подготовка и проведение исследования: для проведения сушки согласно рекомендациям по получению твердых форм хитозана [119, 137] требуется замораживание растворов хитозана при минус 80 °С 2-3 часа до полного затвердевания смеси. Режим сублимации устанавливался экспериментально по определению влажности полученного продукта при условиях, указанных в Таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Режимы проведения сублимационной сушки и заморозки

№ режима	Режим замораживания	Режим сушки Давление: 0,016 мбар	Режим досушивания Давление: 0,085 мбар	Температура конденсатора
1	2-3 часа, -80°C	Длительность: 10 ч	Длительность: 2 ч	-80°C
2		Длительность: 20 ч	Длительность: 4 ч	
3		Длительность: 40 ч	Длительность: 8 ч	
4		Длительность: 60 ч	Длительность: 12 ч	

Для получения твердой формы аскорбата хитозана были использованы образцы, полученные на предыдущем этапе исследования: раствор №3 содержащий хитозан 200 кДа в 3 % аскорбиновой кислоте и раствор №4 содержащий хитозан 500 кДа в 4 % аскорбиновой кислоте. Образцы разливали в полимерную тару по 50 мл и ставили замораживаться. После заморозки образцов аскорбата хитозана их переносили в предварительно подготовленную (температура конденсатора минус 80°C) сублимационную сушилку, накрывали куполом и вакуумировали до нужного значения. Образец сушился согласно режимам, указанным в Таблице 3.6.

Оценку результатов проведения сублимационной сушки проводили на основании значений показателя влажности полученных образцов, который определяли согласно ГФ РФ XIV, результаты исследований представлены в Таблице 3.7. [10]. Определение режима сублимационной сушки для получения твердых форм аскорбата хитозана проводилось на двух образцах в трех повторностях, выбранных в ходе исследования по получению растворимых форм хитозана. В Таблице 3.7. представлены средние значения результатов инструментального определения влажности.

Таблица 3.7 – Результаты исследования получение твердых образцов хитозана

№ режима сублимационной сушки (Общее время сушки)	№ серии растворов	Влажность, %
Режим 1 (12 часов)	3	3,10
	4	3,50
Режим 2 (24 часа)	3	1,30
	4	1,70
Режим 3 (48 часов)	3	0,30
	4	0,50
Режим 4 (72 часа)	3	0,25
	4	0,47

На основании сочетания наименьшего значения содержания влаги в образцах после сублимационной сушки за наименьшее время, для получения твердой формы аскорбата хитозана был установлен режим №3. Согласно полученным результатам исследований была разработана твердая форма носителя на основе модификации хитозана для разработки состава ЛФ.

3.2.5. Фракционный анализ измельченного аскорбата хитозана

В соответствии с ГФ РФ XIV ОФС 1.4.1.0010.15 «Порошки» требуется, чтобы размер частиц порошка был не более 160 мкм, поэтому для разработки ЛС на основе твердой формы аскорбата хитозана требуется проведение фракционного анализа [10].

Измельчение полученных образцов проводилось на центробежной мельнице ударно-стирательного типа Retsch ZM 200. После проведения измельчения порошок аскорбата хитозана был разделен на фракции путем просеивания через лабораторную машину просеивания Cisa с различными ситами. Первоначально полученный порошок просеивали через сито с размерами пор в 160 мкм, которое определено ГФ РФ XIV, затем часть порошка подвергалась микроскопическому анализу, а другая часть – фракционному анализу.

Данный метод позволяет анализировать частицы, не видимые вооруженным глазом и составить их описание, которое необходимо согласно требованиям ГФ РФ XIV ОФС.1.4.1.0010.15 «Порошки» [10].

Для микроскопического анализа была использована суспензия порошков. В качестве дисперсионной среды для приготовления суспензии небольшое количество порошка массой 1,0 мг вносили в дисперсионную среду в объеме 50 мл из расчета получения 0,5 % суспензии. После перемешивания каплю суспензии помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом. Из пробы для испытаний готовили два препарата и сравнивали их под микроскопом. Если они совпадали, то визуальное определение проводили на одном из них [68]. Результаты исследований для образца №3, полученного из раствора №3 аскорбата хитозана 200 кДа содержащего 3 % аскорбиновой кислоты, представлен на Рисунке 3.2., а для образца №4, полученного из раствора №4 аскорбата хитозана 500 кДа содержащего 4 % аскорбиновой кислоты, представлен на Рисунке 3.3.

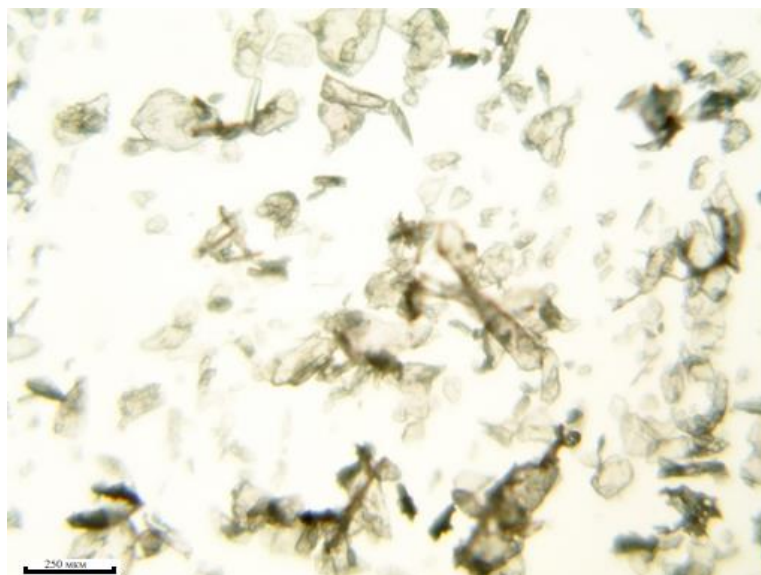


Рисунок 3.2 – Микрофотография образца №3, полученного из раствора №3 аскорбата хитозана 200 кДа содержащего 3 % аскорбиновой кислоты, после измельчения

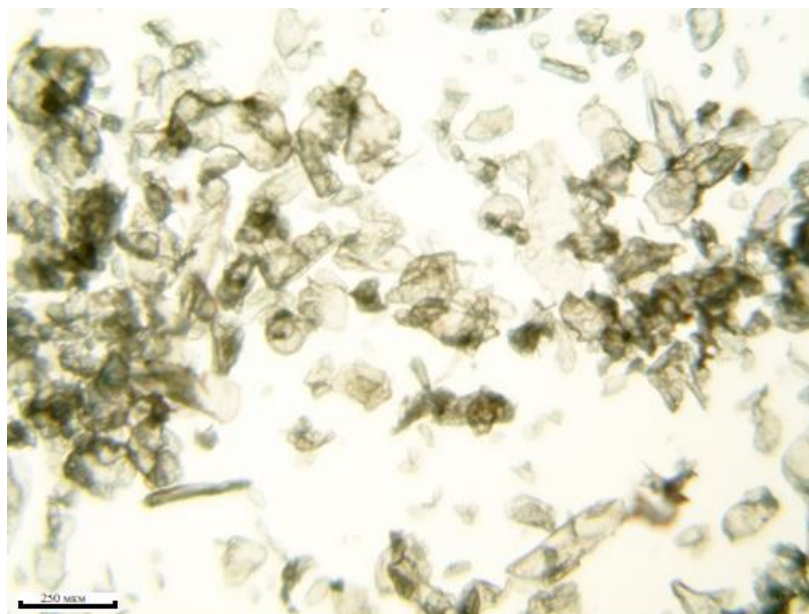


Рисунок 3.3 – Микрофотография образца №4, полученного из раствора №4 аскорбата хитозана 500 кДа содержащего 4 % аскорбиновой кислоты, после измельчения

На представленных фотографиях видно, что частицы порошка аскорбата хитозана обоих образцов имели неоднородную структуру, шероховатую поверхность, а их средний размер имел различные значения в широком диапазоне.

В качестве одной из характеристик для описания полидисперсной системы часто применяют средний диаметр частиц системы или ее фракции [68]. Данный параметр возможно определить с помощью ситования. Данный метод позволяет дифференцировать частицы по размеру, которое необходимо согласно требованиям ГФ РФ XIV ОФС.1.4.1.0010.15 «Порошки» [10]. Оставшуюся часть порошка взвешивали и подвергали фракционированию. Каждую

фракцию, прошедшую через сито определенного размера, взвешивали и вес в процентном выражении заносили в Таблицу 3.8. Верхнее сито обозначали знаком (-), а оставшуюся на данном сите знаком (+). Все размеры сит указаны в мкм. Средние показатели вычисляли из пяти определений. Фракционный состав порошка ФС представлен в Таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Фракционный состав порошка образцов аскорбата хитозана

№ образца аскорбата хитозана	Содержание фракций, %						
	Фракция - 50	Фракция - 50 + 80	Фракция - 80 + 100	Фракция - 100 + 120	Фракция - 120 + 140	Фракция - 140 + 160	Фракция + 160
3	0,56	3,12	5,45	9,32	74,81	6,47	0,27
4	0,45	1,86	6,38	10,57	76,54	4,01	0,19

На основании полученных данных, строили гистограмму распределения порошка по размеру частиц (Рисунок 3.4.).

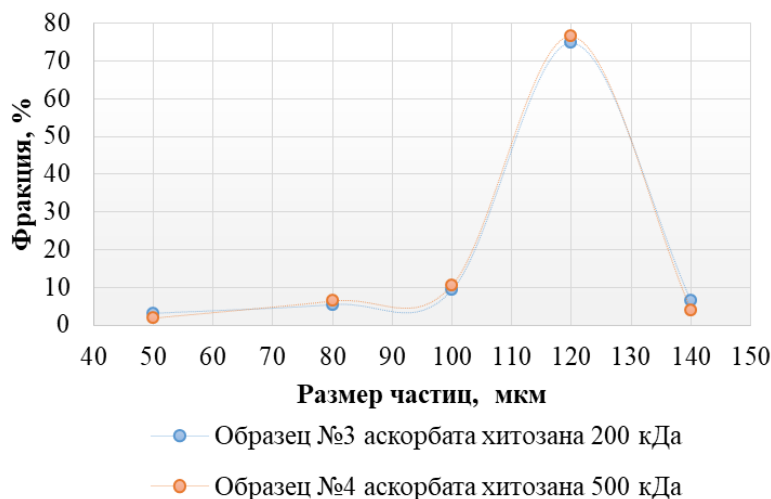


Рисунок 3.4 – Гистограмма фракционного анализа порошка образцов аскорбата хитозана

Кривые распределения Гаусса для порошка аскорбата хитозана, изображенные на Рисунке 3.4. показывают, что фракционный состав частиц после измельчения двух образцов порошка аскорбата хитозана имеет однородный состав. После процесса измельчения наблюдалось, что преобладающей фракцией частиц являются частицы от 120 до 140 мкм для обоих образцов аскорбата хитозана.

Полученный порошок аскорбата хитозана после однократного измельчения подходит для разработки твердой ЛФ в виде порошка для наружного применения.

3.2.6. Насыпная плотность порошка твердой формы аскорбата хитозана

Определение параметра насыпная плотность играет ключевую роль при определении дозировки для лекарственных средств наружного способа применения. А определение параметров сыпучести и угол естественного откоса играют ключевую роль при выборе упаковки и определяют качество лекарственного средства.

Для продолжения разработки лекарственного средства на основе фракционированного порошка аскорбата хитозана требуется изучение его фармацевтико-технологических характеристик для выяснения количества, которое потребуется на одну дозу ЛП. Было решено взять за точку отсчета 0,5 см порошка, а дозировку рассчитывать согласно массе порошка на 0,5 см³.

Для выяснения массы порошка, занимающего 0,5 см³ было проведено изучение насыпной плотности образцов порошка согласно ГФ РФ XIV [10]. Результаты исследования представлены в Таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Результаты исследования насыпной плотности образцов аскорбата хитозана

№ образца аскорбата хитозана	Насыпная плотность, мг/мл	Масса на одну дозу, мг
3	239,59	119,80
4	249,27	124,64

Как видно из Таблицы 3.9. масса порошка, покрывающая 1 см² раны равна 119,80 и 124,64 мг для образцов Х2А3 и Х5А4 соответственно. Однако дробная часть полученных значений имела не ровный порядок, что является неблагоприятным фактором процесса получения и обеспечения однородности дозирования. Поэтому значения массы на одну дозу были округлены в сторону большего, и имели вид: 120,00 и 125,00 мг для образцов аскорбата хитозана №3 и №4 соответственно.

3.3. Изучение физико-химических и технологических характеристик составов лекарственных средств

3.3.1. Разработка и получение составов лекарственных средств

На основе полученных данных и результатов исследований, приведенных в предыдущих разделах, были разработаны две формы ЛС на основе полимеров аскорбата хитозана. Для улучшения технологической характеристики «Сыпучесть» было решено добавить в состав разрабатываемого ЛС кремния диоксид (Аэросил марки 150), так как его показатель кислотности

более близок к рН раны, по сравнению с другим, активно применяемым в фармацевтической промышленности антислеживающим агентом – тальком, показатель рН которого сдвинут в щелочную сторону, вследствие содержания оксидов щелочноземельных металлов в составе [8, 9]. Также аэросил предположительно не препятствует высвобождению действующих веществ, из-за невозможности образования прочных химических связей между молекулами кремния диоксида и ферментативным ЛС. Поэтому было решено взять кремния диоксид в качестве антислеживающего агента для дальнейшей разработки составов ЛС. Разработанные составы представлены в Таблицах 3.10. и 3.11.

Кремния диоксид (Аэросил марки 150) должен отвечать требованиям по характеристике «средний размер частиц». Поэтому перед использованием кремния диоксид подвергался анализу в лабораторной системе просеивания Cisa путем просеивания через со средним размером частиц 160 мкм. Фракция, не прошедшая через сито 160 мкм, подвергалась измельчению и последующему ситовому анализу.

Таблица 3.10 – Разработанные составы ЛС на основе аскорбата хитозана 200 кДа

№ образца состава ЛС	Описание состава	Содержание на дозу, мг	Содержание, %
№1	Активные вещества:		
	Гиалуронидаза	1,00	0,76
	Химопсин	10,00	7,63
	Вспомогательные вещества:		
	Аскорбат хитозана	120,00	91,61
	Сумма	131,00	100,00
№2	Активные вещества:		
	Гиалуронидаза	1,00	0,76
	Химопсин	10,00	7,63
	Вспомогательные вещества:		
	Аскорбат хитозана	118,61	90,61
	Кремния диоксид	1,32	1,00
	Сумма	131,00	100,00
№3	Активные вещества:		
	Гиалуронидаза	1,00	0,76
	Химопсин	10,00	7,63
	Вспомогательные вещества:		
	Аскорбат хитозана	117,38	89,61
	Кремния диоксид	2,62	2,00
	Сумма	131,00	100,00
№4	Активные вещества:		
	Гиалуронидаза	1,00	0,76
	Химопсин	10,00	7,63
	Вспомогательные вещества:		
	Аскорбат хитозана	116,07	88,61
	Кремния диоксид	3,93	3,00
	Сумма	131,00	100,00

Получение разработанных составов проводилось согласно правилам получения сложных порошков. Для этого измельченный аскорбат хитозана и кремния диоксид смешивали с ферментативными лекарственными средствами [44].

Для осуществления выбора качественной лекарственной формы требуется проведение исследований структурно-механических и технологических свойств составов лекарственного средства: структурно-механических, технологических и биофармацевтических свойств составов лекарственного средства. Для оценки качества разрабатываемого ЛС были проведены следующие исследования: сыпучести, насыпной плотности и поверхностной электризуемости, а также исследования высвобождения ферментов из лекарственного средства.

Таблица 3.11 – Разработанные составы ЛС на основе аскорбата хитозана 500 кДа

№ образца состава ЛС	Описание состава	Содержание на дозу, мг	Содержание, %
№5	Активные вещества:		
	Гиалуронидаза	1,00	0,74
	Химопсин	10,00	7,35
	Вспомогательные вещества:		
	Аскорбат хитозана	125,00	91,91
	Сумма	136,00	100,00
№6	Активные вещества:		
	Гиалуронидаза	1,00	0,74
	Химопсин	10,00	7,35
	Вспомогательные вещества:		
	Аскорбат хитозана	123,75	91,91
	Кремния диоксид	1,25	1,00
	Сумма	136,00	100,00
№7	Активные вещества:		
	Гиалуронидаза	1,00	0,74
	Химопсин	10,00	7,35
	Вспомогательные вещества:		
	Аскорбат хитозана	122,50	91,91
	Кремния диоксид	2,50	2,00
	Сумма	136,00	100,00
№8	Активные вещества:		
	Гиалуронидаза	1,00	0,74
	Химопсин	10,00	7,35
	Вспомогательные вещества:		
	Аскорбат хитозана	121,25	91,91
	Кремния диоксид	3,75	3,00
	Сумма	136,00	100,00

Для решения многофакторных задач при разработке ЛС используются различные методы построения обобщенного показателя для осуществления выбора наилучшего состава. Одним из наиболее удобных способов, обобщения огромного массива исследованных факторов, выступает

обобщенная функция желательности Харрингтона. Поэтому результаты исследования было решено подвергнуть анализу при помощи этого метода.

3.3.2. Изучение насыпного объема составов лекарственного средства

Определение насыпного объема является одной из важнейших характеристик дозированных порошков, так как от него зависит количество порошка при расчете дозы ЛС. Определение данного фактора основывается на определении массы и объема измеренного порошка. Также при помощи данного параметра возможно определить прессуемость состава, что является важным фактором при хранении ЛС, так как порошок может слежаться, изменить насыпную плотность и снизить значения показателя однородности дозирования. Определение насыпного объема проводили согласно методике, описанной в ГФ РФ XIV ОФС 1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» [10]. Результаты исследования насыпной плотности образцов составов ЛС представлена в Таблице 3.12.

Таблица 3.12 – Результаты исследования насыпной плотности образцов составов лекарственного средства

№ образца состава ЛС	Масса, г	Насыпная плотность до уплотнения мг/мл	Объем после, мл	Насыпная плотность после уплотнения, мг/мл	Коэффициент прессуемости, %
№1	2,63	262,66	90,00	270,07	10,00
№2	2,60	259,78	87,50	276,04	12,50
№3	2,58	257,49	85,00	281,75	15,00
№4	2,50	250,01	80,00	290,01	20,00
№5	2,72	272,13	92,50	275,58	7,50
№6	2,70	270,36	87,50	288,41	12,50
№7	2,68	268,08	82,50	303,13	17,50
№8	2,62	261,47	75,00	328,62	25,00

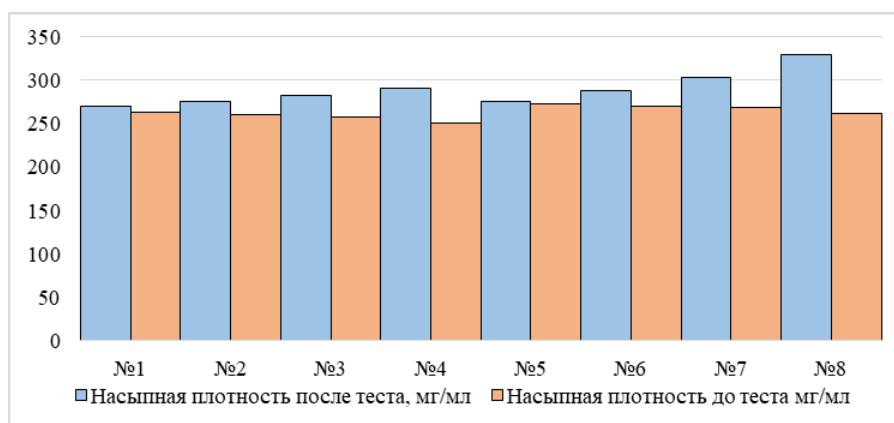


Рисунок 3.5 – Гистограмма результатов исследования насыпной плотности образцов составов лекарственного средства до и после проведения теста

Анализ полученных данных показывает, что различность результатов исследований насыпной плотности до механического воздействия на порошок не превышают 5 %, что существенно не влияет на точность дозирования ферментативной субстанции и укладываются в пределы ошибки по спецификации на сырье.

3.3.3. Изучение сыпучести составов лекарственного средства

Определение сыпучести является одной из важнейших технологических характеристик дозированных порошков, которые показывают способность порошка сыпаться из упаковки. Данная характеристика определяется по методике, описанной в ГФ РФ XIV ОФС 1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» и оценивается двумя показателями: углом естественного откоса и собственно сыпучестью материала [10].

Определение показателя скорости протекания через воронку проводилось с помощью точной навески массой 100,00 г и секундомера с точностью $\pm 0,1$ с. Результаты исследования представлены в Таблице 3.13. и 3.14.

Таблица 3.13 – Результаты исследования сыпучести образцов составов лекарственного средства на основе аскорбата хитозана 200 кДа

№ образца состава ЛС	t, с	v_c	\bar{v}_c	k	$k_{\bar{\alpha}}$	Степень сыпучести
№1	63,50	1,57	1,56	48,18	44,19	Удовлетворительная
	65,80	1,52		43,54		
	62,50	1,60		40,84		
	RSD	2,62		8,40		
№2	58,40	1,71	1,70	35,24	37,19	Удовлетворительная
	60,20	1,66		38,94		
	57,90	1,73		37,38		
	RSD	2,04		5,00		
№3	53,60	1,87	1,81	31,19	34,12	Хорошая
	55,01	1,82		34,71		
	57,50	1,74		36,45		
	RSD	3,53		7,85		
№4	58,10	1,72	1,76	39,98	37,86	Удовлетворительная
	57,05	1,75		35,15		
	55,74	1,79		38,44		
	RSD	2,08		6,52		

Примечания: v_c – скорость протекания образцов ЛС через отверстие воронки, г/с; \bar{v}_c – среднее значение скорости протекания образцов ЛС через отверстие воронки, t – время, за которое весь образец порошка ЛС проходит через воронку, с; k_{α} – угол естественного откоса образцов порошка, $k_{\bar{\alpha}}$ – среднее значение угла естественного откоса образцов ЛС

Проведенные исследования по показателю «Скорость протекания через воронку» показывают влияние кремния диоксида на лекарственную форму, все порошки имеют стабильные показатели сыпучести, различия которых не превышают 10 %, что соответствует требованиям ГФ РФ XIV.

Проведенный анализ данных показал корреляцию данных для обоих образцов аскорбата хитозана, демонстрирующая самую лучшую сыпучесть образцов, содержащих 2 % кремния диоксида (образцы ЛС №3 и №7). Однако при дальнейшем увеличении количества кремния диоксида наблюдалось снижение показателя «Скорость протекания через воронку».

Таблица 3.14 – Результаты исследования сыпучести образцов составов лекарственного средства на основе аскорбата хитозана 500 кДа

№ образца состава ЛС	t, с	v_c	\bar{v}_c	k	k_{α}	Степень сыпучести
№5	75,6	1,32	1,35	46,18	46,25	Удовлетворительная
	74,8	1,34		45,48		
	72,3	1,38		47,10		
	RSD	2,34		0,81		
№6	62,1	1,61	1,60	36,52	37,61	Удовлетворительная
	63,7	1,57		38,87		
	61,9	1,62		37,45		
	RSD	1,56		1,18		
№7	59,6	1,68	1,71	30,97	33,85	Хорошая
	58,3	1,72		36,15		
	57,1	1,75		34,42		
	RSD	2,14		2,64		
№8	60,12	1,66	1,65	36,84	37,80	Удовлетворительная
	59,45	1,68		39,39		
	62,66	1,60		37,16		
	RSD	2,75		1,39		

Примечания: v_c – скорость протекания образцов ЛС через отверстие воронки, г/с; \bar{v}_c – среднее значение скорости протекания образцов ЛС через отверстие воронки, t – время, за которое весь образец порошка ЛС проходит через воронку, с; k_{α} – угол естественного откоса образцов порошка, k_{α} – среднее значение угла естественного откоса образцов ЛС

Проведенные исследования по показателю «Естественный угол откоса» показывают влияние кремния диоксида на лекарственную форму; все порошки имеют стабильные показатели сыпучести, различия которых не превышают 10 %, что косвенно демонстрирует однородность смешивания составов.

Проведенный анализ данных показал корреляцию данных для обоих образцов аскорбата хитозана, демонстрирующие самую лучшую степень сыпучести у образцов, содержание кремния диоксида в которых составила 2 % (образцы составов ЛС №3 и №7).

3.3.4. Изучение поверхностной электризуемости составов лекарственных средств

Проведение данного исследования обусловило тот факт, что кремния диоксид обладает неблагоприятными свойствами поверхностной электризуемости и возможностью пылить, которая зависит от его содержания. Данное физическое явление может повлиять на сыпучесть через отверстия потребительской упаковки. Поэтому было решено провести дополнительные исследования сыпучести через стандартизированную воронку, чтобы оценить влияние присутствия кремния диоксида. Для проведения данного исследования были использованы воронки с отличным от регламентируемого в ГФ РФ XIV диаметром отверстия: 8, 6, 3, 2, 1 мм.

Методика проведения анализа сыпучести осталась без изменений, но был введен дополнительный критерий механического воздействия на порошок, имеющий обозначение в Таблице как МВ. Механическое воздействие проводилось при помощи нескольких побудительных ударов по воронке пальцем. Если и это не способствовало высыпанию, то порошку присваивался в данном критерии «-» и исследование сыпучести данных составов ЛС не проводилось. Результаты исследований представлены в Таблицах 3.15. и 3.16.

Анализ результатов сыпучести порошков через воронки с отверстием отличным от регламентируемого показал, что образцы, не содержащие в составе диоксида кремния, показали наихудшие результаты по данному показателю. Образцы на основе аскорбата хитозана с молекулярной массой 200 кДа требуют механического воздействия для проведения исследования сыпучести порошков через воронки с диаметром отверстия 3 и 2 мм или совсем не проходят и не подвергаются анализу через воронку с отверстием 1 мм.

Таблица 3.15 – Результаты исследования поверхностной электризуемости для составов лекарственных средств на основе аскорбата хитозана с молекулярной массой 200 кДа

Диаметр мм	8			6			3			2			1		
№ образца состава ЛС	t, с	v_c	\bar{v}_c	t, с	v_c	\bar{v}_c	t, с	v_c	\bar{v}_c	t, с	v_c	\bar{v}_c	t, с	v_c	\bar{v}_c
№1	67,45	1,48	1,47	70,47	1,42	1,42	80,51	1,24	1,22	82,85	1,21	1,21			
	65,91	1,52		68,94	1,45		81,38	1,23		79,13	1,26				
	70,52	1,42		72,51	1,38		83,64	1,20		86,54	1,16				
	RSD	3,42			2,53			1,96			4,48				
MB	Не требуется			Не требуется			Требуется			Требуется			–		
№2	64,23	1,56	1,57	68,31	1,46	1,47	80,59	1,24	1,26	80,54	1,24	1,24	83,71	1,19	1,22
	61,67	1,62		66,47	1,50		78,71	1,27		79,45	1,26		80,17	1,25	
	65,39	1,53		69,94	1,43		77,97	1,28		81,25	1,23		81,59	1,23	
	RSD	3,02			2,55			1,70			1,13			2,17	
MB	Не требуется			Не требуется			Не требуется			Не требуется			Не требуется		
№3	59,45	1,68	1,69	63,62	1,57	1,59	75,94	1,32	1,33	77,34	1,29	1,26	85,16	1,17	1,21
	60,78	1,65		61,71	1,62		73,57	1,36		79,98	1,25		83,07	1,20	
	57,13	1,75		63,29	1,58		76,87	1,30		80,67	1,24		79,78	1,25	
	RSD	3,15			1,64			2,28			2,24			3,31	
MB	Не требуется			Не требуется			Не требуется			Не требуется			Требуется		
№4	65,1	1,54	1,59	67,13	1,49	1,47	83,15	1,20	1,21	84,91	1,18	1,20	88,24	1,13	1,10
	60,1	1,66		69,87	1,43		80,58	1,24		81,14	1,23		90,71	1,10	
	63,38	1,58		66,59	1,50		85,01	1,18		83,58	1,20		94,47	1,06	
	RSD	4,09			2,56			2,70			2,31			3,42	
MB	Не требуется			Не требуется			Не требуется			Требуется			Требуется		

Примечания: v_c – скорость протекания образцов ЛС через отверстие воронки, г/с; \bar{v}_c – среднее значение скорости протекания образцов ЛС через отверстие воронки, t – время, за которое весь образец порошка ЛС проходит через воронку, с; k_α – угол естественного откоса образцов порошка, $k_{\bar{\alpha}}$ – среднее значение угла естественного откоса образцов ЛС

Таблица 3.16 – Результаты исследования поверхностной электризуемости для составов лекарственных средств на основе аскорбата хитозана с молекулярной массой 500 кДа

Диаметр мм	8			6			3			2			1		
№ образца состава ЛС	t, с	v_c	\bar{v}_c	t, с	v_c	\bar{v}_c	t, с	v_c	\bar{v}_c	t, с	v_c	\bar{v}_c	t, с	v_c	\bar{v}_c
№5	79,63	1,26	1,27	83,09	1,20	1,22	82,12	1,22	1,21						
	80,18	1,25		80,38	1,24		85,75	1,17							
	77,37	1,29		81,57	1,23		81,22	1,23							
	RSD	1,90		1,66	2,85										
MB	Не требуется			Не требуется			Требуется			–			–		
№6	65,11	1,54	1,53	70,14	1,43	1,43	79,04	1,27	1,27	81,71	1,22	1,26	80,29	1,25	1,24
	63,74	1,57		68,19	1,47		77,65	1,29		77,96	1,28		79,52	1,26	
	66,92	1,49		71,09	1,41		80,21	1,25		79,05	1,27		82,52	1,21	
	RSD	2,44		2,13	1,63		2,40	1,91							
MB	Не требуется			Не требуется			Не требуется			Не требуется			Не требуется		
№7	64,71	1,55	1,58	68,67	1,46	1,48	75,68	1,32	1,28	81,75	1,22	1,25	80,23	1,25	1,22
	63,98	1,56		65,12	1,54		78,46	1,27		79,07	1,26		82,71	1,21	
	61,27	1,63		69,47	1,44		81,14	1,23		78,65	1,27		83,78	1,19	
	RSD	2,90		3,48	3,49		2,08	2,23							
MB	Не требуется			Не требуется			Не требуется			Не требуется			Требуется		
№8	67,06	1,49	1,49	72,57	1,38	1,42	77,58	1,29	1,26	82,64	1,21	1,23	86,47	1,16	1,19
	65,70	1,52		69,14	1,45		78,02	1,28		79,73	1,25		83,21	1,20	
	68,48	1,46		70,16	1,43		81,71	1,22		81,05	1,23		81,57	1,23	
	RSD	2,07		2,47	2,82		1,79	2,95							
MB	Не требуется			Не требуется			Не требуется			Требуется			Требуется		

Примечания: v_c – скорость протекания образцов ЛС через отверстие воронки, г/с; \bar{v}_c – среднее значение скорости протекания образцов ЛС через отверстие воронки, t – время, за которое весь образец порошка ЛС проходит через воронку, с; k_α – угол естественного откоса образцов порошка, $k_{\bar{\alpha}}$ – среднее значение угла естественного откоса образцов ЛС

Образцы на основе аскорбата хитозана с молекулярной массой 500 кДа требуют механического воздействия для проведения исследования через воронки с диаметром отверстия 6 и 3 мм и не проходят, и не подвергаются анализу через воронку с отверстием 2 и 1 мм.

Анализ результатов сыпучести порошков через воронки с отверстием отличным от регламентируемого показал, что образцы, содержащие в составе 1 % диоксида кремния, показали наилучшие результаты по данному показателю, так как образцы на основе аскорбата хитозана с молекулярной массой 200 и 500 кДа не требуют механического воздействия для анализа данного показателя.

Образцы, содержащие в составе 2 и 3 % диоксида кремния, показали средние результаты, из-за увеличения влияния кремния диоксида на состав разрабатываемого ЛС.

3.3.5. Изучение высвобождения протеолитического фермента из составов лекарственных средств

Одним из методов исследования высвобождения действующих веществ является тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР). Данный метод анализа позволяет доказать эквивалентность высвобождения ЛС, а, следовательно, доказать качество для разрабатываемых составов ЛФ.

Поэтому было решено проводить доказательство качества, разрабатываемого ЛС методом ТСКР по двум показателям: определение высвобождения протеолитического и амилолитической ферментативной системы. Ввиду невозможности одновременной идентификации двух ферментативных субстанций было решено проводить определение высвобождения при помощи 2 различных методик анализа.

Исследование высвобождения ферментативной протеолитической системы из ЛФ было проведено согласно Решению Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 года №85 «Об утверждении правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». В качестве референтного ЛС использовался лиофилизат химопсина в количестве 20 МЕ (10 мг), зарегистрированный на территории РФ [11, 24].

Исследование высвобождения проводили в среде субстрата со значением $pH=6,2\pm 0,2$, что соответствует оптимуму проведения ферментативной реакции химопсина, а также кислотности экссудативной жидкости раны [7, 11, 37]. Условия проведения анализа высвобождения (ТСКР) протеолитического фермента представлены в Таблице 2.7.

Количество высвободившегося протеолитического фермента устанавливали согласно разработанной и валидированной аналитической методике спектрофотометрического определения по значениям оптической плотности продуктов ферментативной реакции, после проведения реакции с реактивом Фолина [7]. Аналитическая методика определения представлена в главе 5. Значение высвобождения протеолитического фермента в среду казеината натрия в % вычисляли по формуле:

$$Q_{(t)} = \frac{A_t \times a_0}{A_0 \times L} \times 100,$$

где A_t – значение оптической плотности раствора, исследуемого ЛС в установленный момент времени; a_0 – значение калибровочной точки, мг; A_0 – значение оптической плотности в калибровочной точке; L – масса ФС в мг, содержащаяся в порошке; $Q_{(t)}$ – значение высвобождения, %.

Для оценки высвобождения требовалось провести анализ, используя значения ниже и выше предела определения аналитической методики. Поэтому было решено провести ферментативную реакцию с субстратом в объеме 500 мл для захвата широко диапазона определения. В процессе пробоподготовки были получены три группы образцов по способу разведения. Такой подход позволил не изменять методику определения, и одновременно получить за счет процесса пробоподготовки оптимальные результаты определения протеолитической активности.

Методика процесса пробоподготовки: из реакционной колбы в требуемый промежуток времени аккуратно отбирали 10 мл ферментированного раствора, переносили в пробирку для центрифугирования объемом 50 мл, затем приливали 10 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин. Супернатант в объеме 18 мл переносили в вials и выпаривали при 100 °С до сухого остатка. Сухой остаток растворяли в требуемом объеме дистиллированной воды, после растворения сухого остатка добавляли такой же объем реактива Фолина. Продолжительность реакции – 20 мин. Объемы разведений представлены в Таблице 3.17.

Таблица 3.17 – Условия проведения процесса пробоподготовки для изучения высвобождения протеолитического фермента

Время, мин	Объем пробы, мл	Объем ТХУ, мл	Объем аликвоты, мл	Объем дистиллированной воды, мл	Объем раствора реактива Фолина
10	10,00	10,00	18,00	0,125	0,125
15	10,00	10,00	18,00	0,125	0,125
30	10,00	10,00	18,00	0,25	0,250
45	10,00	10,00	18,00	0,25	0,250
60	10,00	10,00	18,00	0,50	0,500
90	10,00	10,00	18,00	0,50	0,500
120	10,00	10,00	18,00	1,00	1,000
150	10,00	10,00	18,00	1,00	1,000

Примечания: ТХУ – трихлоруксусная кислота

Исследование биоэквивалентности проводилось на 12 образцах каждого лекарственного средства, что соответствует Решению совета ЕЭК от 3 ноября 2016 года №85 [24]. Результаты исследования лекарственных средств и препарата сравнения, а также метрологические измерения представлены в приложении А.

Для проведения исследования биоэквивалентности высвобождения лекарственных средств были приготовлены по 1 серии лекарственного препарата с массой 40,00 г. Соотнесение номеров серии и образцов ЛС представлена в Таблице 3.18.

Таблица 3.18 – Маркировка серий образцов порошка

№ образца состава ЛС	№ серии
№1	№ 11506
№2	№ 21706
№3	№ 32106
№4	№ 42306
№5	№ 52806
№6	№ 63006
№7	№ 70507
№8	№ 80707

Для математической оценки биоэквивалентности высвобождения были рассчитаны факторы подобия для образцов ЛС и препарата сравнения, которые представлены в Таблицах 3.19 и 3.20. Расчет фактора подобия позволяет подтвердить эквивалентность или доказать неэквивалентность высвобождения ЛС в сравнении с референтным препаратом согласно формуле:

$$f_2 = 50 \times \log \left(\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} (\bar{Q}_R(t) - \bar{Q}_T(t))^2}{n}}} \right)$$

где f_2 – фактор подобия; $\bar{Q}_R(t)$ – среднее значение степени высвобождения ферментного препарата в конкретный момент времени для препарата сравнения, %; $\bar{Q}_T(t)$ – среднее значение степени высвобождения ферментного препарата в конкретный момент времени для исследуемого образца лекарственного средства, %; n – Количество временных точек

Достоверность и приемлемость полученных результатов доказывается согласно требованиям к характеристике RSD. Требования к данным оценки биоэквивалентности высвобождения, установленные в Решении ЕЭК по статистической характеристике RSD, составляют не более 10% различия результатов внутри образцов одного состава ЛС [24].

При модификации высвобождения в сторону снижения данного показателя значения фактора подобия будут стремиться к 0 (менее 50), таким образом будет доказано, что высвобождение лекарственного средства происходит медленнее, чем препарата сравнения. Поэтому для доказательства модификации высвобождения был определен фактор подобия для начальных точек (10, 15, 30, 45 мин), который представлен в Таблице 3.19 и 3.20.

Исследование по изучению пролонгации высвобождения ЛС было установлено по определению значений активности ферментов в широком диапазоне времени, с доказательством течения ферментативной реакции. Результаты анализа значений фактора подобия должны укладываться в интервал от 50 до 100 единиц для доказательства эквивалентности кривых высвобождения ферментативного препарата для оценки пролонгированного действия лекарственных средств.

В ходе исследований проведены экспериментальные работы по получению фактических результатов высвобождения протеолитического фермента из 8 различных составов исследуемого ЛС, проведенных для оценки эффективности, и серий оригинального ЛП, в качестве сравнения. Результаты средних значений высвобождений для составов на основе аскорбат хитозана 200 кДа представлены на Рисунке 3.4., а для составов на основе аскорбат хитозана 500 кДа представлены на Рисунке 3.5.

Таблица 3.19 – Значения фактора подобия для лекарственных средств на основе Аскорбата хитозана молекулярной массой 200 кДа

Образец (доза, мг)		Образцы лекарственного средства, порошок											
		Среда: Казеинат натрия рН=6,2±0,2											
		Время отбора											
		10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
№ 11506 (131)	Q _t	33,16	61,18	73,13	90,64	95,75	95,85	95,90	95,93	95,88	95,95	96,07	96,07
	CO	0,1252	0,1307	0,0883	0,0661	0,1282	0,0726	0,1305	0,0924	0,0892	0,1240	0,1299	0,1138
	RSD	0,38	0,21	0,12	0,07	0,13	0,08	0,14	0,10	0,09	0,13	0,14	0,12
	f ₂	41,90					63,73						
№ 21706 (131)	Q _t	34,95	64,40	75,23	92,14	96,35	96,44	96,50	96,63	96,77	96,87	97,08	97,11
	CO	0,1142	0,1304	0,1255	0,0691	0,1030	0,0636	0,1179	0,0761	0,0853	0,1507	0,1182	0,1024
	RSD	0,33	0,20	0,17	0,07	0,11	0,07	0,12	0,08	0,09	0,16	0,12	0,11
	f ₂	45,44					68,65						
№ 32106 (131)	Q _t	38,57	68,33	88,27	95,37	97,48	97,62	97,78	97,84	98,01	98,27	98,57	98,79
	CO	0,1407	0,0988	0,1289	0,0830	0,1145	0,0843	0,1090	0,1098	0,0794	0,1507	0,1371	0,0758
	RSD	0,36	0,14	0,15	0,09	0,12	0,09	0,11	0,11	0,08	0,15	0,14	0,08
	f ₂	57,78					79,91						
№ 42306 (131)	Q _t	38,33	66,92	78,65	94,00	96,83	96,97	97,08	97,24	97,47	97,60	97,75	97,80
	CO	0,0962	0,1268	0,1052	0,0757	0,1182	0,0901	0,1251	0,0782	0,0824	0,1173	0,1198	0,1149
	RSD	0,25	0,19	0,13	0,08	0,12	0,09	0,13	0,08	0,08	0,12	0,12	0,12
	f ₂	50,96					73,43						
Референтный ферментативный лекарственный препарат «Химопсин» Лиофилизат 10 мг. Серия 741219.													
Q _t		46,99	79,00	90,09	97,18	99,57	99,59	99,63	99,71	99,69	99,62	99,63	99,47
CO		0,1050	0,1067	0,1202	0,0812	0,1249	0,0776	0,1186	0,0892	0,0707	0,1411	0,1181	0,1257
RSD		0,22	0,14	0,13	0,08	0,13	0,08	0,12	0,09	0,07	0,14	0,12	0,13

Примечания: f₂ – фактор подобия, Q – средние значение высвобождения фермента, CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение;

Таблица 3.20 – Значения фактора подобия для лекарственных средств на основе Аскорбата хитозана молекулярной массой 500 кДа

Образец (доза, мг)		Образцы лекарственного средства, порошок											
		Среда: Казеинат натрия рН=6,2±0,2											
		Время отбора											
		10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
№ 52806 (136)	Q _t	31,50	54,65	69,54	88,17	94,68	94,71	94,81	95,03	95,08	95,30	95,36	95,40
	CO	0,1236	0,1232	0,1421	0,0749	0,1169	0,0762	0,0968	0,0804	0,0719	0,1428	0,1128	0,0990
	RSD	0,39	0,23	0,20	0,08	0,12	0,08	0,10	0,08	0,08	0,15	0,12	0,10
	f ₂	36,87					59,20						
№ 63006 (136)	Q _t	32,96	60,34	72,17	90,55	95,36	95,45	95,61	95,77	95,88	96,01	96,17	96,30
	CO	0,1144	0,1219	0,1185	0,0830	0,1260	0,0751	0,1017	0,0894	0,0878	0,1153	0,1224	0,1292
	RSD	0,35	0,20	0,16	0,09	0,13	0,08	0,11	0,09	0,09	0,12	0,13	0,13
	f ₂	41,02					63,06						
№ 70507 (136)	Q _t	34,93	62,45	73,11	93,73	96,74	96,93	97,15	97,36	97,48	97,66	97,86	98,06
	CO	0,1174	0,1146	0,1250	0,0781	0,0943	0,0854	0,1282	0,0805	0,0811	0,1265	0,1101	0,0976
	RSD	0,34	0,18	0,17	0,08	0,10	0,09	0,13	0,08	0,08	0,13	0,11	0,10
	f ₂	43,56					73,83						
№ 80707 (136)	Q _t	33,73	61,32	72,67	91,54	95,92	96,13	96,21	96,35	96,47	96,51	96,58	96,67
	CO	0,1424	0,1280	0,1118	0,0767	0,1176	0,0687	0,1115	0,0901	0,0873	0,1389	0,1328	0,1125
	RSD	0,42	0,21	0,15	0,08	0,12	0,07	0,12	0,09	0,09	0,14	0,14	0,12
	f ₂	42,10					66,26						
Референтный ферментативный лекарственный препарат «Химопсин» Лиофилизат 10 мг. Серия 741219.													
Q _t		46,99	79,00	90,09	97,18	99,57	99,59	99,63	99,71	99,69	99,62	99,63	99,47
CO		0,1050	0,1067	0,1202	0,0812	0,1249	0,0776	0,1186	0,0892	0,0707	0,1411	0,1181	0,1257
RSD		0,22	0,14	0,13	0,08	0,13	0,08	0,12	0,09	0,07	0,14	0,12	0,13

Примечания: f_2 – фактор подобия, Q – средние значение высвобождения фермента, CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение;

Достоверность и приемлемость полученных результатов доказаны и не превышают значений, требуемых согласно Решению Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 года №85 по требованиям к характеристике RSD [24].

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №1 серии № 11506 и референтного ЛП «Химопсин» Серии № 741219 для начальных точек составили 41,90, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 63,73.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №2 серии № 21706 и референтного ЛП «Химопсин» Серия № 741219 для начальных точек составили 45,44, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 68,65.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №3 серии № 32106 и референтного ЛП «Химопсин» Серия № 741219 для начальных точек составили 57,78, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 79,91.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №4 серии № 42306 и референтного ЛП «Химопсин» Серия № № 741219 для начальных точек составили 50,96, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 73,43.

Значения факторов подобия составов ЛС №1 и №2, рассчитанные для начального промежутка времени, показывают, что данные составы ЛС обладают неэквивалентным высвобождением по отношению к референтному ЛП. А значение факторов подобия составов ЛС №3 и №4 рассчитанные для начального промежутка времени показывают, что данные составы ЛС обладают эквивалентным высвобождением по отношению к референтному ЛП. Данный результат подтверждается на Рисунке 3.6., который указывает на заниженные значения высвобождения для начального промежутка времени относительно референтного ЛП.

Значение фактора подобия для всех составов на основе аскорбата хитозана с молекулярной массой 200 кДа, рассчитанное для конечных точек, начиная с 60 минуты, показывает, что данный состав ЛС обладает эквивалентным высвобождением в сравнении с референтным ЛП. Данные результаты указывают на сниженные значения высвобождения для начального промежутка времени относительно референтного ЛП. Значения полученных результатов приведены на Рисунке 3.6.

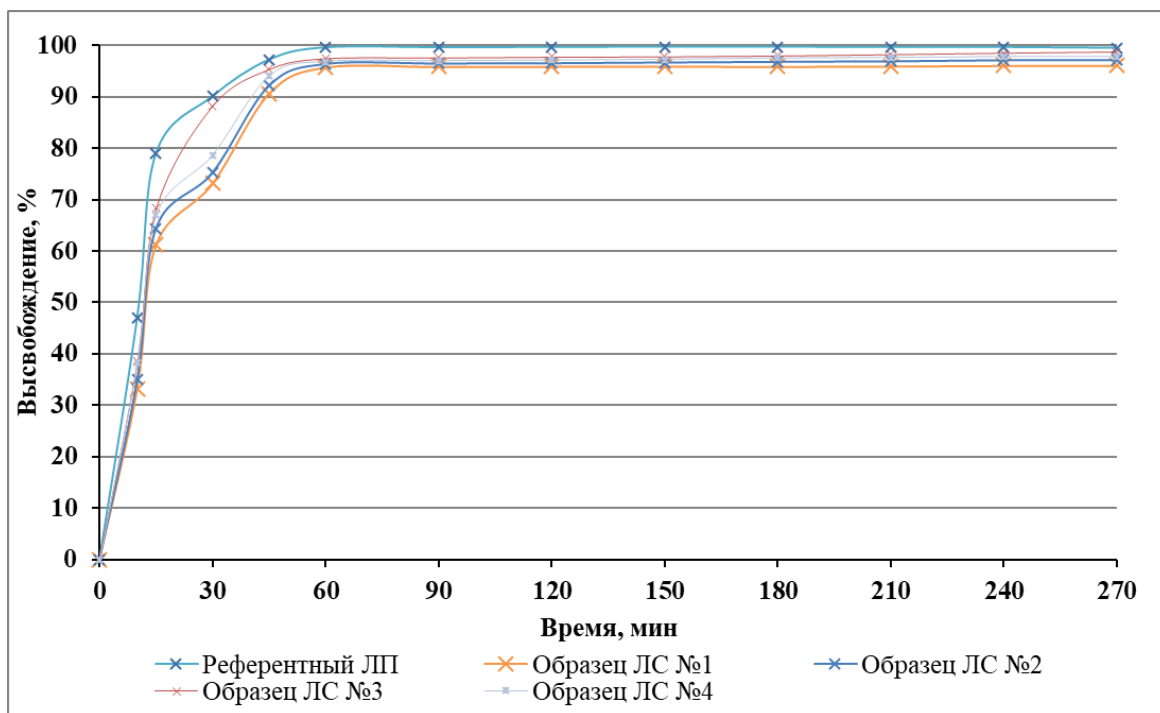


Рисунок 3.6 – Средние значения высвобождения протеолитического фермента для лекарственных средств на основе Аскорбата хитозана молекулярной массой 200 кДа

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №5 серии № 11506 и референтного ЛП «Химопсин» Серия № 741219 для начальных точек составили 36,87, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 59,20.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №6 серии № 21706 и референтного ЛП «Химопсин» Серия № № 741219 для начальных точек составили 41,02, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 63,06.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №7 серии № 32106 и референтного ЛП «Химопсин» Серия № № 741219 для начальных точек составили 43,56, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 73,83.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №8 серии № 42306 и референтного ЛП «Химопсин» Серия № № 741219 для начальных точек составили 42,10, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 66,26.

Значения факторов подобия всех составов на основе аскорбата хитозана с молекулярной массой 500 кДа рассчитанные для начального промежутка времени показывают, что данные составы ЛС обладают неэквивалентным высвобождением в сравнении с референтным ЛП. Данный результат подтверждается на Рисунке 3.7. который указывает на заниженные значения высвобождения для начального промежутка времени относительно референтного ЛП.

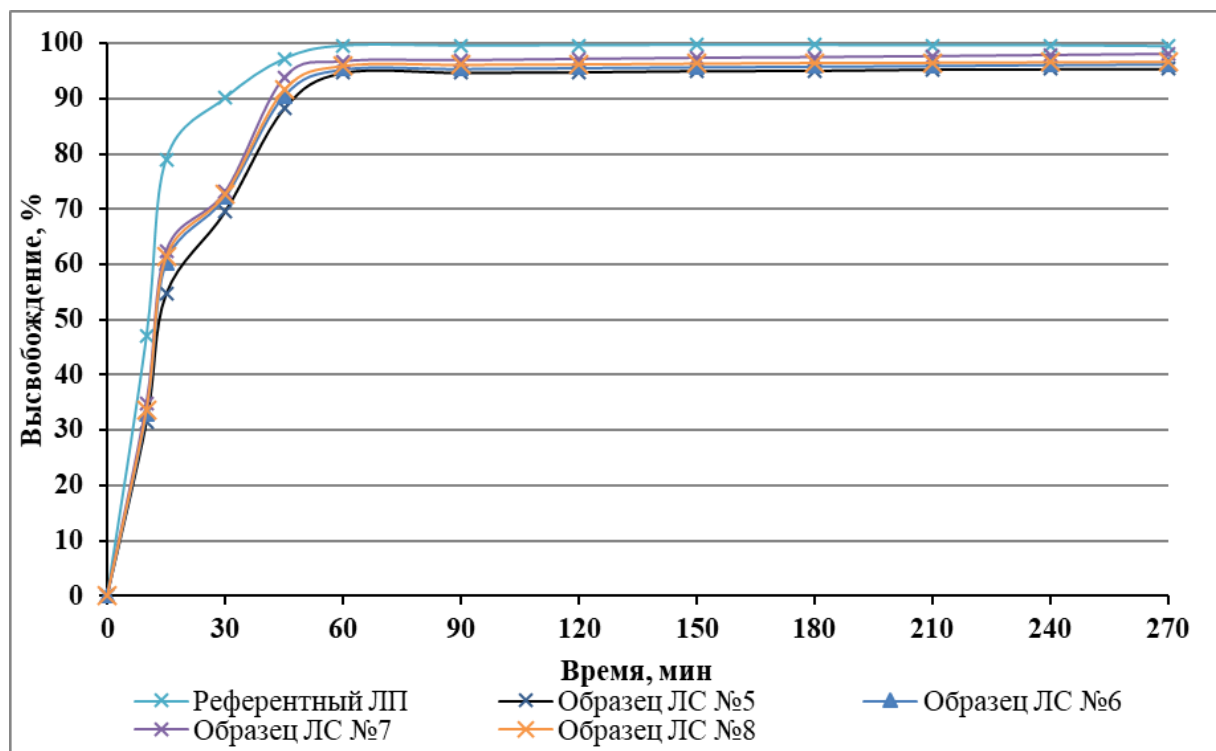


Рисунок 3.7 – Средние значения высвобождения протеолитического фермента для лекарственных средств на основе Аскорбата хитозана молекулярной массой 500 кДа

Самое высокое значение фактора подобия для начальных и конечных точек, начиная с 60 минут, были у составов ЛС №7 и №8, что указывает на наименьшее влияние вспомогательных веществ, входящих в состав ЛС, на высвобождение протеолитического фермента из ЛФ. Эти данные подтверждаются на Рисунке 3.7.

Пролонгация высвобождения действующих веществ из ЛФ наблюдалась более выражено у образцов ЛС №5, №6, №7, №8, содержащие хитозан 500 кДа, согласно рассчитанным факторам подобия на начальном временном интервале (от 0 до 45 мин). Однако значения высвобождения протеолитического фермента в конечные моменты времени были ниже относительно образцов ЛС на основе хитозана 200 кДа.

Следует отметить, что для образцов ЛС №1 и №5 значения высвобождения протеолитического фермента в конечные моменты времени были ниже относительно образцов ЛС, содержащих кремний диоксид.

Исследования высвобождения протеолитического фермента показывают, что состав ЛФ на основе аскорбата хитозана вызывает пролонгацию в высвобождении протеолитического фермента, а также отражают зависимость между молекулярной массой модифицированного биоразлагаемого полимера и содержанием кремния диоксида в лекарственной форме.

3.3.6. Изучение высвобождения амилолитического фермента из составов лекарственных средств

Исследования высвобождения амилолитического фермента было проведено на модельной субстратной среде, содержащей крахмал, сходной по химическому составу экссудату раны согласно валидированной методике, описанной в главе 5. Для снижения процесса разрушения амилолитического фермента протеолитическим в субстратную среду был введен казиенат натрия. Условия проведения анализа высвобождения (ТСКР) протеолитического фермента представлены в Таблице 2.7.

Для оценки высвобождения требуется провести анализ, используя значения ниже и выше предела определения аналитической методики. Поэтому было решено провести ферментативную реакцию с субстратом в объеме 500 мл для захвата широко диапазона определения. В процессе пробоподготовки были получены три группы образцов по способу разведения. Такой подход позволил не изменять аналитическую методику определения, и получить оптимальные результаты определения амилолитической активности.

Методика основана на количественном определении прогидролизованного крахмала в результате гидролиза ферментами амилолитического ряда до декстринов различной молекулярной массы в стандартных условиях со спектрофотометрической регистрацией по значениям оптической плотности. Аналитическая методика определения представлена в главе 5.

Методика процесса пробоподготовки: из реакционной колбы в требуемый промежуток времени аккуратно отбирали 5 мл ферментированного раствора, переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили объём до метки рабочим раствором йода [4].

Согласно Решения Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 года №85 количество образцов должно быть не менее 12 [24]. Поэтому исследование биоэквивалентности проводилось на 12 образцах каждого лекарственного средства. Препаратом сравнения служил образец Лидазы в количестве 640 МЕ (1 мг). Результаты исследования лекарственных средств и препарата сравнения, а также метрологические измерения представлены в приложении 2.

Значение высвобождения амилолитического фермента в среду субстрата в процентах вычисляли по формуле:

$$Q_{(t)} = \frac{A_t \times a_0}{A_0 \times L} \times 100,$$

где A_t – значение оптической плотности раствора, исследуемого ЛС в установленный момент времени; a_0 – значение калибровочной точки, мг; A_0 – значение оптической плотности в калибровочной точке; L – масса ФС в мг, содержащаяся в порошке; $Q_{(t)}$ – значение высвобождения, %.

Для проведения исследования биоэквивалентности высвобождения лекарственных средств были приготовлены 8 образцов лекарственного препарата с массой 40 г. Соотнесение номера серии и образцов ЛС представлена в Таблице 3.21.

Таблица 3.21 – Маркировка серий образцов порошка

№ образца состава ЛС	№ серии
№1	№ 11506
№2	№ 21706
№3	№ 32106
№4	№ 42306
№5	№ 52806
№6	№ 63006
№7	№ 70507
№8	№ 80707

Исследование высвобождения проводили в среде субстрата со значением $pH=7,2\pm 0,2$, что соответствует оптимуму проведения ферментативной реакции гиалуронидазы, а также кислотности экссудативной жидкости раны [4, 11, 37].

Для математической оценки биоэквивалентности высвобождения использовались критерии и формула расчета фактора подобия согласно разделу 3.3.5. Результаты анализа фактора подобия представлены в Таблицах 3.22. и 3.23.

В ходе исследований проведены экспериментальные работы по получению фактических результатов высвобождения протеолитического фермента из 8 различных составов исследуемого ЛС и серий оригинального ЛП, в качестве сравнения. Результаты средних значений высвобождений для составов на основе аскорбат хитозана 200 кДа представлены на Рисунке 3.8., а для составов на основе аскорбат хитозана 500 кДа представлены на Рисунке 3.9.

Таблица 3.22 – Значения фактора подобия для лекарственных средств на основе Аскорбата хитозана молекулярной массой 200 кДа

Образец (доза, мг)		Образцы лекарственного средства, порошок											
		Среда: Казеинат натрия рН=7,2±0,2											
		Время отбора											
		10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
№ 11506 (131)	Q _t	49,10	59,56	77,46	90,12	91,94	92,99	94,67	93,62	93,21	93,01	92,76	92,26
	CO	7,4574	5,7784	4,9380	8,0563	6,9984	4,3550	8,0442	5,2327	5,3880	5,6973	7,2761	7,0341
	RSD	15,19	9,70	6,37	8,94	7,61	4,68	8,50	5,59	5,78	6,13	7,84	7,62
	f ₂	38,56					51,36						
№ 21706 (131)	Q _t	52,15	60,79	77,82	93,21	95,49	96,27	96,33	96,13	95,47	94,90	94,31	93,92
	CO	8,6271	5,6121	4,6453	5,8133	2,8833	5,4363	5,5083	3,7946	6,2657	5,5695	5,5713	6,1759
	RSD	16,54	9,23	5,97	6,24	3,02	5,65	5,72	3,95	6,56	5,87	5,91	6,58
	f ₂	40,76					59,83						
№ 32106 (131)	Q _t	56,53	63,66	83,47	96,63	97,36	98,27	98,34	98,59	98,77	97,88	97,02	96,63
	CO	4,4215	6,1272	8,0921	7,4847	4,9309	4,9047	5,2806	4,8455	7,1746	5,2531	4,7659	6,6082
	RSD	7,82	9,62	9,69	7,75	5,06	4,99	5,37	4,91	7,26	5,37	4,91	6,84
	f ₂	46,52					72,98						
№ 42306 (131)	Q _t	58,61	62,98	78,55	90,12	93,35	96,08	96,43	96,24	95,97	94,65	92,58	91,30
	CO	5,8531	6,1521	7,7914	7,9477	8,7582	5,3545	6,0978	7,4481	5,6310	4,0983	6,2336	7,3682
	RSD	9,99	9,77	9,92	8,82	9,38	5,57	6,32	7,74	5,87	4,33	6,73	8,07
	f ₂	44,11					55,09						
Референтный ферментативный лекарственный препарат «Лидаза» Лиофилизат 10 мг. Серия № 841119.													
Q _t		69,17	81,28	92,21	97,27	99,77	99,29	100,36	99,57	96,77	99,80	99,77	100,75
CO		5,6183	7,3466	3,9825	3,8287	4,6160	8,0357	7,6034	5,2056	6,2227	7,4390	7,9793	5,7902
RSD		8,12	9,04	4,32	3,94	4,63	8,09	7,58	5,23	6,43	7,45	8,00	5,75

Примечания: f₂ – фактор подобия, Q – средние значение высвобождения фермента, CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение

Таблица 3.23 – Значения фактора подобия для лекарственных средств на основе Аскорбата хитозана молекулярной массой 500 кДа

Образец (доза, мг)		Образцы лекарственного средства, порошок											
		Среда: Казеинат натрия рН=7,2±0,2											
		Время отбора											
		10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
№ 52806 (136)	Q _t	44,51	57,51	70,67	80,15	85,56	88,57	91,89	91,37	90,85	90,57	90,55	90,30
	CO	4,4446	5,7413	7,0649	7,7642	8,4284	6,0130	4,0765	3,9050	5,0373	7,0756	7,0245	6,6708
	RSD	9,98	9,98	10,00	9,69	9,85	6,79	4,44	4,27	5,54	7,81	7,76	7,39
	f ₂	32,89					42,83						
№ 63006 (136)	Q _t	49,65	60,11	77,41	85,43	88,11	91,23	92,71	93,15	92,37	91,99	91,39	90,55
	CO	4,9551	4,5481	6,0909	4,5081	8,5552	6,4156	4,3581	5,5170	5,1781	4,5635	5,7436	5,3101
	RSD	9,98	7,57	7,87	5,28	9,71	7,03	4,70	5,92	5,61	4,96	6,28	5,86
	f ₂	38,14					46,36						
№ 70507 (136)	Q _t	33,16	61,18	73,13	90,64	95,75	95,85	95,90	95,93	95,88	95,95	96,07	96,07
	CO	5,3236	4,9920	7,4797	6,2585	5,1253	5,0292	5,4177	7,0167	4,6999	5,6993	4,9940	4,3339
	RSD	9,48	8,01	9,75	7,09	5,48	5,30	5,66	7,31	4,89	5,99	5,31	4,65
	f ₂	31,93					63,40						
№ 80707 (136)	Q _t	53,61	55,05	77,05	86,34	90,71	93,65	93,53	94,10	93,06	92,62	91,58	88,57
		5,2264	5,2987	6,5325	7,2081	3,3685	4,8108	4,8518	7,7424	5,5598	4,7252	5,8459	3,1192
		9,75	9,62	8,48	8,35	3,71	5,14	5,19	8,23	5,97	5,10	6,38	3,52
	f ₂	37,34					48,13						
Референтный ферментативный лекарственный препарат «Лидаза» Лиофилизат 10 мг. Серия № 841119.													
	Q _t	69,17	81,28	92,21	97,27	99,77	99,29	100,36	99,57	96,77	99,80	99,77	100,75
	CO	5,6183	7,3466	3,9825	3,8287	4,6160	8,0357	7,6034	5,2056	6,2227	7,4390	7,9793	5,7902
	RSD	8,12	9,04	4,32	3,94	4,63	8,09	7,58	5,23	6,43	7,45	8,00	5,75

Примечания: f_2 – фактор подобия, Q – средние значение высвобождения фермента, CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение

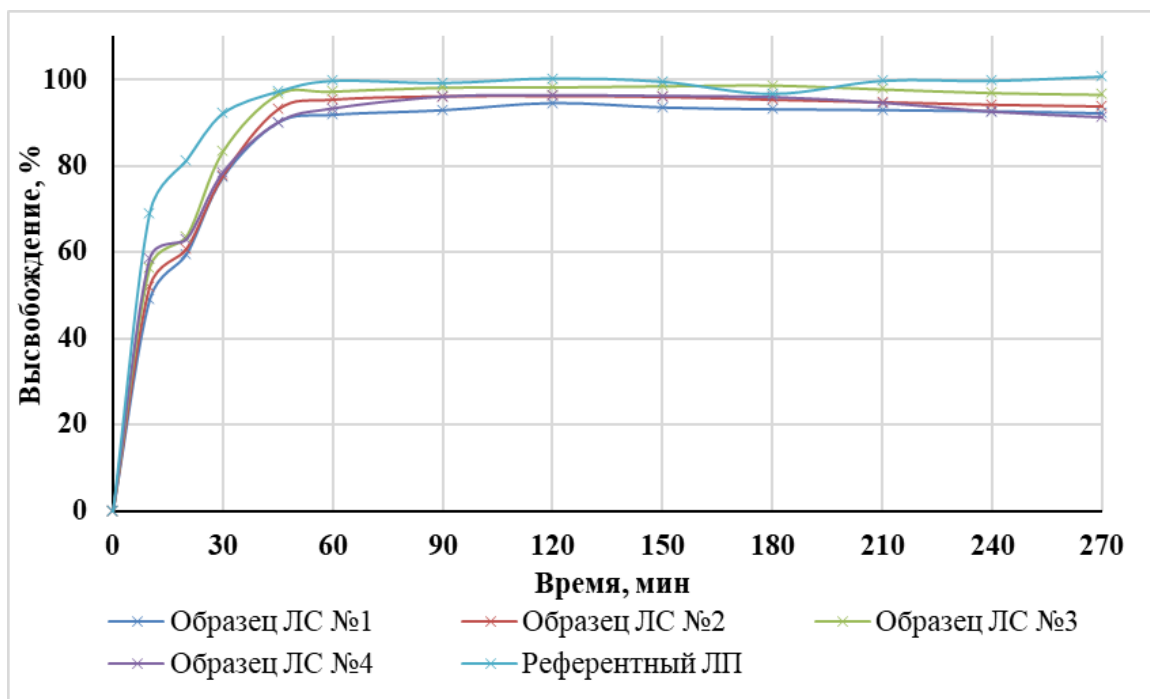


Рисунок 3.8 – Средние значения высвобождения амилалитического фермента для лекарственных средств на основе Аскорбата хитозана молекулярной массой 200 кДа

Достоверность и приемлемость полученных результатов доказывается согласно требованиям к характеристике RSD. Требования к данным оценки биоэквивалентности высвобождения, установленные в Решении Совета ЕЭК № 85 по статистической характеристике RSD, составляют не более 10 % различия результатов внутри образцов одного состава ЛС.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №1 серии № 11506 и референтного ЛП «Лидаза» Серии № 841119 для начальных точек составили 38,56, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 59,83.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №2 серии № 21706 и референтного ЛП «Лидаза» Серии № 841119 для начальных точек составили 40,76, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 68,65.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №3 серии № 32106 и референтного ЛП «Лидаза» Серии № 841119 для начальных точек составили 46,52, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 72,98.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №4 серии № 42306 и референтного ЛП «Лидаза» Серии № 841119 для начальных точек составили 44,11, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 55,09.

Значение факторов подобия для всех составов ЛС на основе аскорбата хитозана с молекулярной массой 200 кДа, рассчитанного для начального промежутка времени, показывает, что данные составы ЛС обладают неэквивалентным высвобождением в сравнении с референтным ЛП. Данный результат подтверждается на Рисунке 3.8., который указывает на

существенные различия в значениях высвобождения для начального промежутка времени относительно референтного ЛП.

Факторы подобия для составов ЛС №3 и №4, рассчитанные для начального промежутка времени показывают, что данные образцы ЛС обладают эквивалентным высвобождением в сравнении с референтным ЛП.

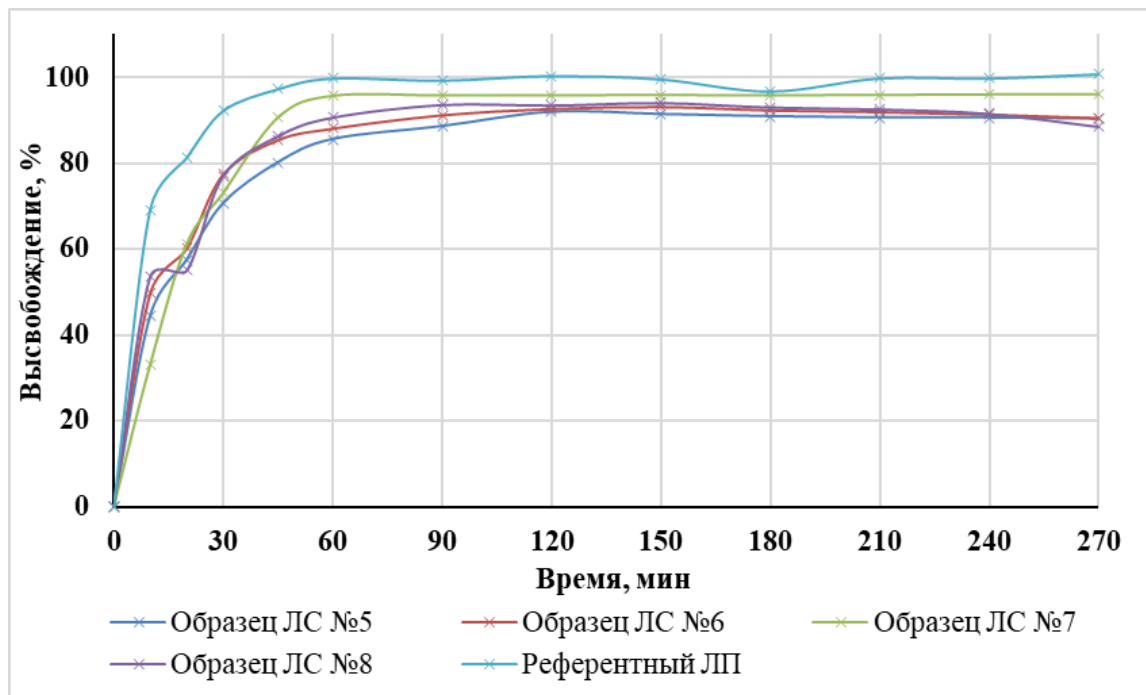


Рисунок 3.9 – Средние значения высвобождения амилолитического фермента для лекарственных средств на основе Аскорбата хитозана молекулярной массой 500 кДа

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №5 серии № 52806 и референтного ЛП «Лидаза» Серии № 841119 для начальных точек составили 32,89, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 42,83.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №6 серии № 63006 и референтного ЛП «Лидаза» Серии № 841119 для начальных точек составили 38,14, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 46,36.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №7 серии № 70507 и референтного ЛП «Лидаза» Серии № 841119 для начальных точек составили 31,93, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 63,40.

Результаты рассчитанных факторов подобия (f_2) для состава ЛС №8 серии № 80707 и референтного ЛП «Лидаза» Серии № 841119 для начальных точек составили 37,34, а для конечных точек, начиная с 60 минуты, составили 48,13.

Значение факторов подобия всех составов на основе аскорбата хитозана с молекулярной массой 500 кДа, рассчитанное для начального промежутка времени показывает, что данные составы ЛС обладают не эквивалентным высвобождением в сравнении с референтным ЛП.

Данный результат подтверждается на Рисунке 3.9., который указывает на существенные различия значений высвобождения для начального промежутка времени относительно референтного ЛП.

Значение фактора подобия составов ЛС №5, №6 и №8 на основе аскорбата хитозана с молекулярной массой 500 кДа, рассчитанное для конечных точек, начиная с 60 минуты, показывает, что данный состав ЛС обладает неэквивалентным высвобождением в сравнении с референтным ЛП.

Самое высокое значение фактора подобия для начальных и конечных точек, начиная с 60 минут, наблюдалось у состава ЛС №7, что указывает на наименьшее влияние вспомогательных веществ и протеолитического фермента, входящих в состав ЛС, на высвобождение амилолитического фермента из ЛФ. Эти данные подтверждаются на Рисунках 3.8. и 3.9.

Исследования высвобождения амилолитического фермента показывают, что состав ЛФ на основе аскорбата хитозана вызывает пролонгацию в высвобождении амилолитического фермента, а также отражают зависимость между молекулярной массой модифицированного биоразлагаемого полимера и содержанием кремния диоксида в лекарственной форме.

3.4. Выбор оптимального состава лекарственного средства с помощью математического моделирования на основе многофакторного анализа

Выбор состава лекарственного средства для дальнейшего получения должен основываться на результатах научно-обоснованных исследований по разработке лекарственной формы.

Успешное понимание многофакторности разработки ЛС определяется одновременно несколькими значениями всех измеряемых характеристик, из которых невозможно выделить один главный фактор, влияющий на качество получаемой ЛФ. А отслеживание качества продукта при помощи одного фактора может существенно снизить эффективность ЛС [29].

Массивы данных, содержащие результаты исследований, собранные в ходе проведения разработки состава ЛС, представляют собой огромный набор количественных и качественных характеристик и критериев приемлемости, определяемых согласно НД. Для определения межфакторной взаимосвязи характеристик требуется проведение дисперсионного анализа, по результатам которого возможно установить влияние каждого отдельного фактора на качество, а, следовательно, вероятное изменение эффективности разрабатываемого ЛС. В подобных случаях эффективно использовать применение сразу двух критериев оценки. Данными критериями выступают дисперсионный анализ при помощи метода ANOVA (с англ. analysis of variance) для

определения взаимосвязи характеристик и корреляционный анализ с определением веса каждого фактора [47, 134].

Для проведения статистических исследований требуется выделение самого зависимого фактора, который будет выступать в качестве фактора сравнения. Таким фактором был выбран фактор эффективности ЛС – высвобождение амилолитического фермента, так как его высвобождение зависит не только от структурно-механических свойств состава, но и высвобождения протеолитического фермента.

После установления зависимости и веса факторов требуется осуществление выбора наиболее оптимального состава ЛФ. Для решения данной задачи требовалось применение статистических методов, которые способны визуализировать влияние нескольких факторов. Такими методами являются пространство проектных параметров и функция желательности Харингтона.

Пространство проектных параметров имеет ряд ограничений, самым важным из которых является ограничение по количеству исследуемых факторов. Поэтому ввиду наличия большого числа влияющих факторов предпочтительно использовать для статистического анализа функцию желательности Харингтона, которая не обладает данным ограничением [87, 98].

3.4.1. Выявление и оценка взаимосвязи между факторами

Для разработки качественного лекарственного препарата следует рассматривать полученные результаты исследований разработанных составов как взаимосвязь факторов влияющих на эффективность ЛС. Но требуется оценка такой взаимосвязи и понимание того, как изменяется эффективность ЛС, из-за изменения факторов системы [29, 47].

Известно, что в экспериментальных научных исследованиях обычно существует функциональная взаимосвязь. Однако в медицинских науках невозможно точно установить функциональную взаимосвязь между факторами. Это связывают с изучением сложных иерархических систем, таких как лекарственные препараты. Качество и эффективность ЛП зависит от множества факторов с прямой или обратной зависимостью. Поэтому при разработке лекарственных средств разумно применять статистическую взаимосвязь при оценке факторов, входящих в систему [47].

Статистическая взаимосвязь устанавливается, если изменение одного фактора влияет на эффективность высвобождения фармацевтической субстанции или на качество лекарственного препарата. При статистической зависимости строго определенному значению фактора сравнения, например, эффективность высвобождения, соответствует некоторое множество значений признаков, например, сыпучесть или насыпная плотность [47].

Однако наиболее важным при качественной оценке коэффициента корреляции является установление силы этой связи. Для этого использовалась шкала Чеддока, которая оценивает тесноту взаимосвязи между сравниваемыми факторами. Теснота взаимосвязи фактора показывает, насколько сильно изменится фактор сравнения при изменении фактора признака. В случаях, когда значения коэффициента корреляции факторов указывали на отсутствие зависимости или являлись слабыми, такие значения считались не важными и такие факторы признаков не принимали участия в дальнейшем статистическом исследовании эффективности высвобождения.

Из-за того, что показатель высвобождения оценивался в разные моменты времени целесообразно выполнить оценку корреляционной зависимости во все исследуемые промежутки по отдельности. Данные по исследованию корреляционной зависимости представлены в Таблице 3.24. и Рисунках 3.10. и 3.11.

Таблица 3.24 – Результаты исследования оценки взаимосвязи факторов

ЛС	f_2 (НА)	f_2 (КА)	ρ_n	v_c	k_{α}	$\lim(v_c)$, мм	ММ, кДа	W (SiO ₂)	f_2 (НП)	f_2 (КП)
№1	38,56	51,36	262,66	1,56	44,19	6	200	0	41,90	63,73
№2	40,76	59,83	259,78	1,70	37,19	1	200	1	45,44	68,65
№3	46,52	72,98	257,49	1,81	34,12	2	200	2	57,78	79,91
№4	44,11	55,09	250,01	1,76	37,86	3	200	3	50,96	73,43
№5	32,89	42,83	272,13	1,35	46,25	6	500	0	36,87	59,2
№6	38,14	46,36	270,36	1,60	37,61	1	500	1	41,02	63,06
№7	31,93	63,40	268,08	1,71	33,85	2	500	2	43,56	73,83
№8	37,34	48,13	261,47	1,65	37,80	3	500	3	42,10	66,26
r_{xy} НА	×		-0,8139	0,6612	-0,3439	-0,3116	-0,7893	0,3518	0,8536	0,5869
r_{xy} КА			-0,4608	0,8010	-0,7331	-0,4727	-0,5149	0,3422	0,8382	0,9281

Примечания: f_2 – фактор подобия, ρ_n – насыпная плотность, k_{α} – угол естественного откоса, v_c – сыпучесть, $\lim(v_c)$ – предел сыпучести, ММ – молекулярная масса полимера, W(SiO₂) – содержание кремния диоксида, НА – значение фактора рассчитанное в начальном временном интервале до 60 минут для амилолитического фермента, КА – значение фактора рассчитанное в конечных временном интервале после 60 минут для амилолитического фермента, НП – значение фактора, рассчитанное в начальных временных точках до 60 минут для протеолитического фермента, КП – значение фактора, рассчитанное в конечных временных точках после 60 минут для протеолитического фермента

Как видно из Рисунка 3.10., в начальный момент времени высокую взаимосвязь имеют следующие факторы: насыпная плотность, молекулярная масса полимера, а также фактор подобия протеолитической активности, заметную взаимосвязь имеют: сыпучесть и фактор подобия протеолитической активности в конечный момент времени, умеренную взаимосвязь

имеют: угол естественного откоса, содержание кремния диоксида, предел сыпучести, молекулярная масса полимера.

Как видно из Рисунка 3.11., в конечный момент времени высокую взаимосвязь имеют следующие факторы: сыпучесть, угол естественного откоса, а также факторы подобия протеолитической активности в начальный и конечный момент времени заметную взаимосвязь имеет молекулярная масса, умеренную взаимосвязь имеют: насыпная плотность, содержание кремния диоксида, предел сыпучести.

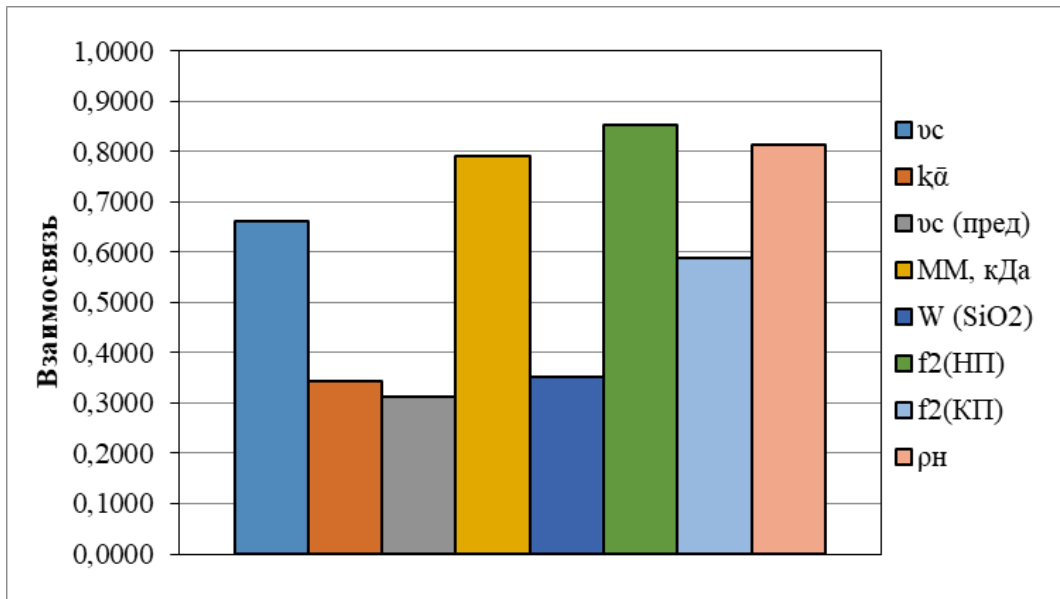


Рисунок 3.10 – Оценка влияния фактора на формирование отклика в начальный момент времени

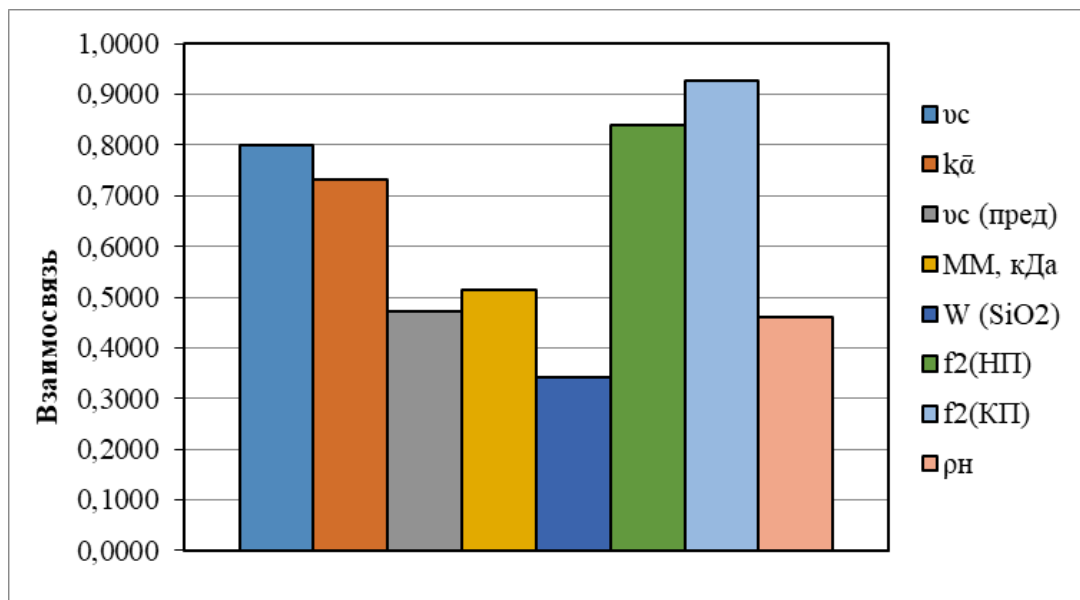


Рисунок 3.11 – Оценка влияния фактора на формирование отклика в конечный момент времени

Согласно статистическому анализу данных все выбранные факторы имеют корреляцию с качеством лекарственных средств, что означает, что они в достаточной степени взаимосвязаны с

качеством ЛС. Однако для дальнейшего анализа требуется сократить влияние факторов одного типа на выбор ЛС.

3.4.2. Уменьшение влияния факторов одной направленности на результаты выбора состава лекарственного средства

В данном диссертационном исследовании большое внимание уделено технологическим факторам, влияющим на сыпучесть ЛС, влияние которых может привести к уменьшению веса других факторов, оказывающих влияние на качество ЛС. Поэтому целесообразно было выделить только те факторы, которые имеют наибольшую корреляцию с качеством ЛС. Для визуализированного представления полученных результатов было решено построить причинно-следственную диаграмму, также ее называют диаграммой Исикавы, представленной на Рисунке 3.12. [61].

Для уменьшения влияния одного типа фактора на дальнейший выбор лекарственного средства целесообразно было разделить их на группы согласно физико-химическим, технологическим свойствам и факторам высвобождения, которые будут сравниваться с эффективностью высвобождения, выраженной через фактор высвобождения амилолитического фермента, как самого зависимого фактора, влияющего на качество. Так как на качество лекарственного средства влияет высвобождение ферментов в начальных и конечных временных интервалах целесообразно рассматривать их по отдельности.

Для разных ЛФ требуется разделение группы факторов «технологические свойства» на несколько основополагающих факторов влияющих на качество получаемого ЛС. Для получения ЛФ порошки основным технологическим свойством, влияющим на качество, является сыпучесть. Благодаря такому разделению факторов было достигнуто снижение сложности расчетов дисперсионного анализа, что приводит к уменьшению ошибок при расчете критерия Фишера.

Как было отмечено ранее, для построения диаграммы Исикавы было решено разделить факторы на 3 группы, поэтому группы получили названия: «технологические свойства лекарственной формы», факторы которой представлены в первой колонке слева, «влияние состава вспомогательных веществ», факторы которой представлены в центральной колонке и «влияние высвобождения протеолитического фермента». При построении диаграммы не отражены данные высвобождения амилолитического фермента среди группы факторов, потому что этот фактор является фактором сравнения и находится в основном скелете диаграммы.

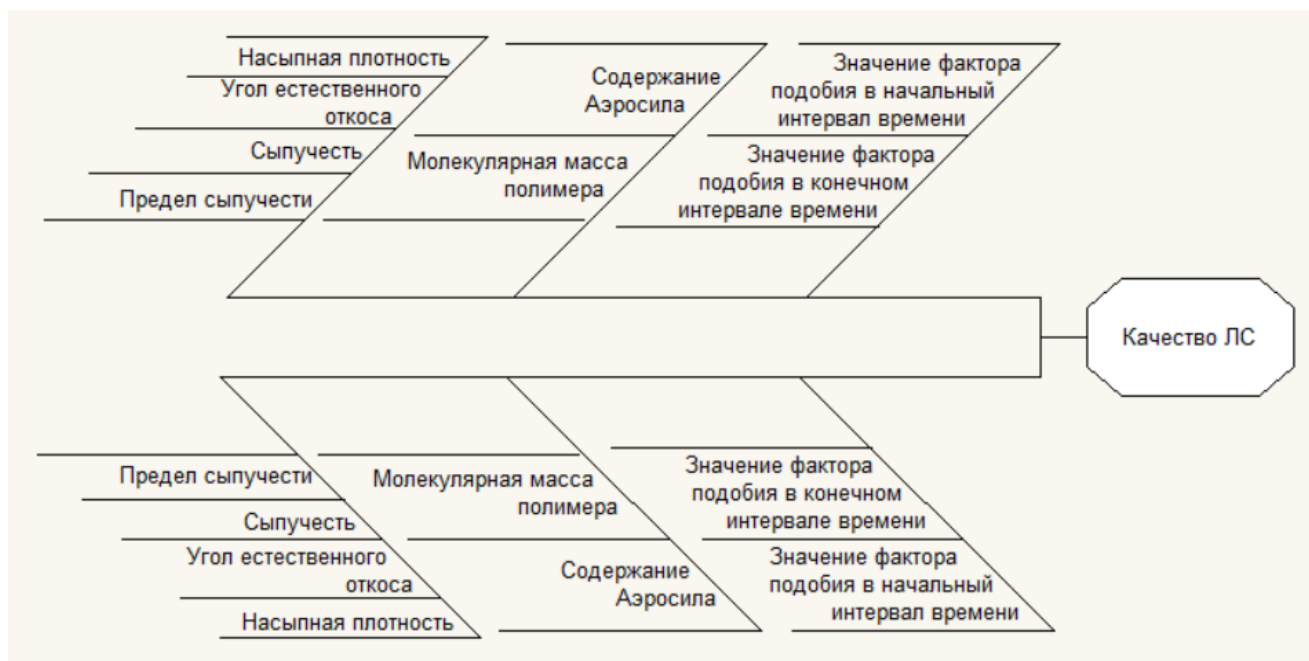


Рисунок 3.12 – Факторы, влияющие на качество разрабатываемого лекарственного средства

Критерием выбора основного фактора влияющего на эффективность высвобождения амилолитического фермента, входящего в группу, был коэффициент корреляции, который оценивает взаимосвязь факторов. Значения коэффициента представлены ранее в Таблице 3.22. Для выбора основного фактора в группе, значение коэффициента корреляции должно стремиться к единице взятого по модулю. Результаты выбора основных факторов представлены в Таблице 3.25.

Таблица 3.25 – Результаты выбора факторов, влияющих на качество лекарственного средства

Группа факторов	Фактор	Коэффициент корреляции
Эффективность высвобождения амилолитического фермента в начальный интервал времени		
Технологические свойства лекарственной формы	Насыпная плотность	- 0,8139
Влияние состава вспомогательных веществ	Молекулярная масса	- 0,7893
Влияние высвобождения протеолитического фермента	Фактор подобия в начальный момент времени	0,8536
Эффективность высвобождения амилолитического фермента в конечный интервал времени		
Технологические свойства лекарственной формы	Сыпучесть	0,8010
Влияние состава вспомогательных веществ	Молекулярная масса	- 0,5149
Влияние высвобождения протеолитического фермента	Фактор подобия в конечный момент времени	0,9281

3.4.3. Оценка степени влияния нескольких факторов на качество разрабатываемого лекарственного средства

При разработке требуется оценка степени влияния одного или нескольких факторов на качество лекарственных средств. В таких случаях наряду с корреляционным анализом при изучении причинно-следственных отношений между факторами требуется применение метода дисперсионного анализа. Этот метод применяется, чтобы сократить число опытных точек, испытаний и объектов наблюдения, которые влияют на изучаемый фактор [29].

Для применения методов дисперсионного анализа обычно планируют *полный факторный эксперимент (ПФЭ)*, где число опытных точек, равно числу сочетаний уровней входных факторов в полном факторном эксперименте, равно произведению числа уровней всех факторов [47]. В данной диссертационной работе мы рассматривали двухфакторный анализ для определения различия между составами и взаимосвязи факторов, влияющих на качество ЛС. Для выполнения анализа были построены две матрицы для результатов, выполненных исследований, которые представлены в Таблицах 3.26. и 3.27.

Таблица 3.26 – Матрица для результатов исследований в начальный момент времени

Составы ЛС	Факторы			
	f_2 (НА)	ρ_n	ММ, кДа	f_2 (НП)
№1	38,56	262,66	200	41,90
№2	40,76	259,78	200	45,44
№3	46,52	257,49	200	57,78
№4	44,11	250,01	200	50,96
№5	32,89	272,13	500	36,87
№6	38,14	270,36	500	41,02
№7	31,93	268,08	500	43,56
№8	37,34	261,47	500	42,10

Примечания: f_2 – фактор подобия, ρ_n – насыпная плотность, ММ – молекулярная масса полимера, НА – значение фактора рассчитанное в начальном временном интервале до 60 минут для амилолитического фермента, НП – значение фактора рассчитанное в начальных временных точках до 60 минут для протеолитического фермента.

Для оценки результатов дисперсионного анализа для определения различия между составами и взаимосвязи факторов, влияющих на качество ЛС, применялись следующие критерии:

- Уровень значимости показывает вероятность, что сравниваемые значения будут больше $F_{\text{табл}}$. То есть уровень значимости должен соответствовать: $p < 0,05$.
- Критерий значимости должен соответствовать: $F_{\text{факт}} > F_{\text{табл}}$. При выполнении данного выражения должно быть доказано, что различия при проведении дисперсионного между сравниваемыми значениями не значительны и выборка является однородной.

Результаты дисперсионного анализа для определения различия между составами и взаимосвязи факторов, влияющих на качество ЛС представлены в Таблицах 3.28. и 3.29.

Таблица 3.27 – Матрица для результатов исследований в конечный момент времени

Составы ЛС	Факторы			
	f_2 (КА)	v_c	ММ, кДа	f_2 (КП)
№1	51,36	1,56	200	63,73
№2	59,83	1,70	200	68,65
№3	72,98	1,81	200	79,91
№4	55,09	1,76	200	73,43
№5	42,83	1,35	500	59,2
№6	46,36	1,60	500	63,06
№7	63,4	1,71	500	73,83
№8	48,13	1,65	500	66,26

Примечания: f_2 – фактор подобию, v_c – сыпучесть, ММ – молекулярная масса полимера, КА – значение фактора рассчитанное в конечных временном интервале после 60 минут для амилолитического фермента, КП – значение фактора рассчитанное в конечных временных точках после 60 минут для протеолитического фермента

Таблица 3.28 – Результаты дисперсионного анализа в начальный момент времени

Источник	SS	df	MS	F _{факт}	p	F _{табл}
Между составами	43573,42	7	6224,77	0,95	0,49	2,49
Между факторами	590312,84	3	196770,95	30,10	$8,55 \times 10^{-8}$	3,07
Погрешность	137278,76	21	6537,08			
Итого	771165,03	31				

Примечания: SS – сумма квадратов, df – число степеней свободы, MS – средний квадрат, F_{факт} – фактический критерий Фишера для выборки, p – критерий значимости, F_{табл} – Табличное значение критерия Фишера

Таблица 3.29 – Результаты дисперсионного анализа в начальный момент времени

Источник	SS	df	MS	F _{факт}	p	F _{табл}
Между составами	40803,70	7	5829,10	0,87	0,54	2,49
Между факторами	590234,30	3	196744,77	29,46	$1,02 \times 10^{-7}$	3,07
Погрешность	140223,60	21	6677,31			
Итого	771261,61	31				

Примечания: SS – сумма квадратов, df – число степеней свободы, MS – средний квадрат, F_{факт} – фактический критерий Фишера для выборки, p – критерий значимости, F_{табл} – Табличное значение критерия Фишера

Результаты дисперсионного анализа ANOVA в начальный и конечный момент времени доказали, что существует различие между составами, так как критерий значимости был больше 0,05 при исследовании обоих выборок, а фактический критерий Фишера был меньше Табличных значений. Поэтому в дальнейших исследованиях составы были рассмотрены как отдельные лекарственные средства, а не как общая выборка.

Результаты дисперсионного анализа ANOVA в начальный момент времени показали отсутствие значимого различия дисперсий при проведении анализа, так как критерий значимости был меньше 0,05 при исследовании выборки, а фактический критерий Фишера был больше Табличных значений. Это доказывает высокое сродство выбранных факторов с формированием качества лекарственного средства в начальный момент времени.

Такие же результаты дисперсионного анализа были получены для факторов в конечный момент времени. Они показали отсутствие значимого различия дисперсий при проведении анализа, так как критерий значимости был меньше 0,05 при исследовании выборки, но в 10 раз больше, чем для начального момента времени, а фактический критерий Фишера был больше Табличных значений. Это также доказывает высокое сродство выбранных факторов с формированием качества лекарственного средства в конечный момент времени.

3.4.4. Выбор оптимального состава при помощи метода факторного анализа

Как отмечено ранее, после установления зависимости и веса факторов требуется осуществление выбора наиболее оптимального состава ЛС. Данный выбор можно осуществить при помощи построения функции желательности Харрингтона, которая относится к методам многофакторного анализа.

Для построения данной функции требуется выбрать функциональный диапазон для факторов, входящих в определение, и закодировать его в диапазоне в значениях от 0 до 10. Но, чтобы получить наилучшее разрешение функции Харрингтона следует закодировать значения согласно виду экспоненциальной функции, то есть в диапазоне от 0 до 5 единиц. Кодировка значений осуществлялась согласно математическому переводу из истинных значений в кодирование [87]. Для визуализации перевода были составлены шкалы, представленные на Рисунке 3.13. Обоснование математического перевода результатов исследований представлены в Таблице 3.30.

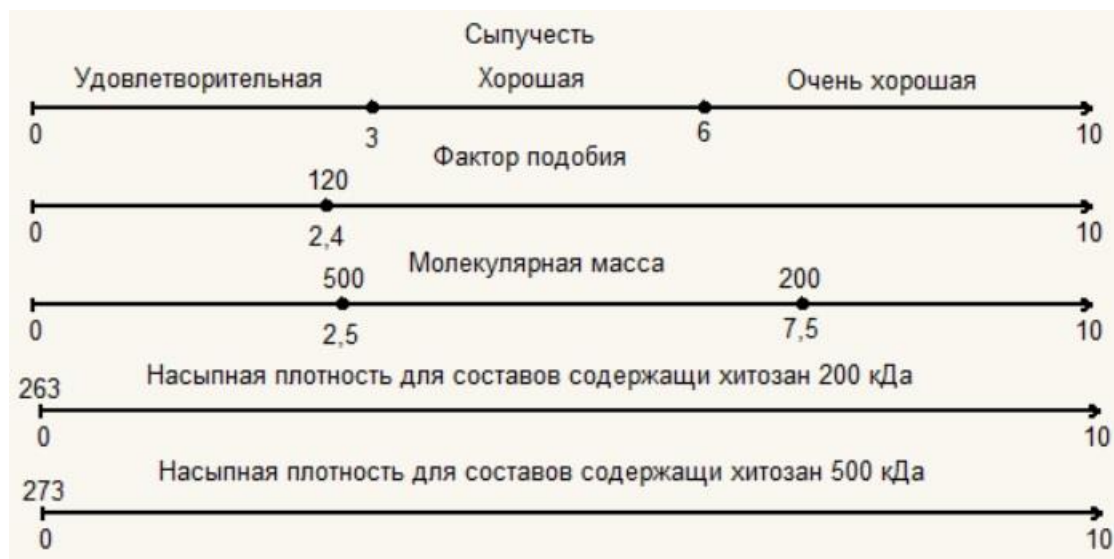


Рисунок 3.13 – Визуализация математического перевода

Таблица 3.30 – Обоснование математического перевода результатов исследований

Фактор	Обоснование
Сыпучесть	Обоснованием является существующая взаимосвязь между фактором сыпучести (скорости протекания через воронку) и степени сыпучести. Поэтому было решено взять шкалу степени сыпучести от удовлетворительных значений до очень хороших. Шкала представлена на Рисунке 3.13.
Фактор подобия	Так как шкала фактора подобия представляет числа в степени 10^2 первоначальный перевод, было решено разделить числа на 10. Однако многие числа не попадают в требуемый диапазон шкалы. Поэтому числа было решено уменьшить еще в 5 раз.
Молекулярная масса полимера	Существующая взаимосвязь молекулярной массы имеет обратную зависимость, (возможно, чего-то не хватает). Поэтому было решено взять условные единицы согласно взаимосвязи. Шкала представлена на Рисунке 3.13.
Насыпная плотность	От насыпной плотности порошка зависит точность дозирования действующих веществ, а, следовательно, качество ЛС. Так как разрабатываемое ЛС в качестве функционального компонента имеют полимеры хитозана с различной молекулярной массой, имеющие различную насыпную плотность, было решено принять за стандарт насыпную плотность образцов препарата содержащие только функциональные компоненты. Шкала представлена на Рисунке 3.13.

Так как построенные шкалы не нормированы, полученные в ходе анализа данные, не имеют взаимосвязь между факторами, поэтому требуется ввести дополнительный коэффициент при расчете функции Харрингтона. Так как коэффициент корреляции отражает взаимосвязь между факторами, влияющих на качество ЛС, было решено ввести в формулу расчета его в качестве множителя для каждого фактора. Формула расчета среднего коэффициента представлена ниже.

$$d_i = \sqrt[n]{r_1(x_1) \times r_2(x_2) \times r_3(x_3) \times r_n(x_n)}$$

где d_i – средний коэффициент расчета для факторов, r – коэффициент корреляции, x – значение фактора, n – количество факторов

Так как анализ значений факторов проводился для начального и конечного момента времени, целесообразно вывести один коэффициент при расчете функции Харрингтона поэтому было решено провести расчет усредненного коэффициента для средних коэффициентов. Формула расчета усредненного коэффициента представлена ниже. Результаты расчетов факторов и результаты анализа исследований при помощи функции желательности Харрингтона представлены в Таблице 3.31.

$$D = \sqrt[2]{d_1 \times d_2}$$

где D – усредненный коэффициент, d_i – средний коэффициент расчета для факторов

В Таблице 3.32. представлены переведенные результаты исследований с учетом коэффициента корреляции. Результаты, рассчитанные согласно формуле, представленной ниже. Визуализация полученных результатов анализа исследований при помощи функции желательности Харрингтона представлена на Рисунке 3.14.

$$X_n = r_n \times x_n$$

где X_n – математически обработанные значения фактора с учетом коэффициента корреляции, r_n – коэффициент корреляции для фактора, x_n – математически обработанные значения фактора, n – порядковый номер фактора

Таблица 3.31 – Результаты анализа составов на основе аскорбата хитозана при помощи функции желательности Харрингтона

Составы ЛС	Время	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	d _i	D
№1	НМВ	0,3571	–	0,7271	0,6297	0,5538	0,5486	0,5550
	КМВ	–	0,4273	0,4743	0,6991	0,7018	0,5616	
№2	НМВ	0,5179	–	0,7271	0,6424	0,5705	0,6095	0,5999
	КМВ	–	0,4813	0,4743	0,7392	0,7204	0,5905	
№3	НМВ	0,6148	–	0,7271	0,6741	0,6230	0,6582	0,6391
	КМВ	–	0,5201	0,4743	0,7927	0,7581	0,6205	
№4	НМВ	0,7672	–	0,7271	0,6611	0,5950	0,6844	0,6387
	КМВ	–	0,5029	0,4743	0,7173	0,7372	0,5959	
№5	НМВ	0,4241	–	0,5464	0,5957	0,5291	0,5199	0,5005
	КМВ	–	0,3387	0,3564	0,6540	0,6834	0,4820	
№6	НМВ	0,5151	–	0,5464	0,6273	0,5496	0,5581	0,5399
	КМВ	–	0,4433	0,3564	0,6732	0,6991	0,5222	
№7	НМВ	0,6090	–	0,5464	0,5898	0,5617	0,5762	0,5666
	КМВ	–	0,4850	0,3564	0,7547	0,7386	0,5571	
№8	НМВ	0,7534	–	0,5464	0,6226	0,5548	0,6140	0,5715
	КМВ	–	0,4626	0,3564	0,6826	0,7115	0,5320	

Примечания: D – усредненный коэффициент, d_i – средний коэффициент расчета для факторов, X₁ – насыпная плотность, X₂ – сыпучесть, X₃ – молекулярная масса полимера, X₄ – фактор подобия для амилолитического фермента, X₅ – фактор подобия для протеолитического фермента, НМВ – переведенные факторы, корреляция которых рассчитана для начального момента времени, КМВ – переведенные факторы, корреляция которых рассчитана для конечного момента времени

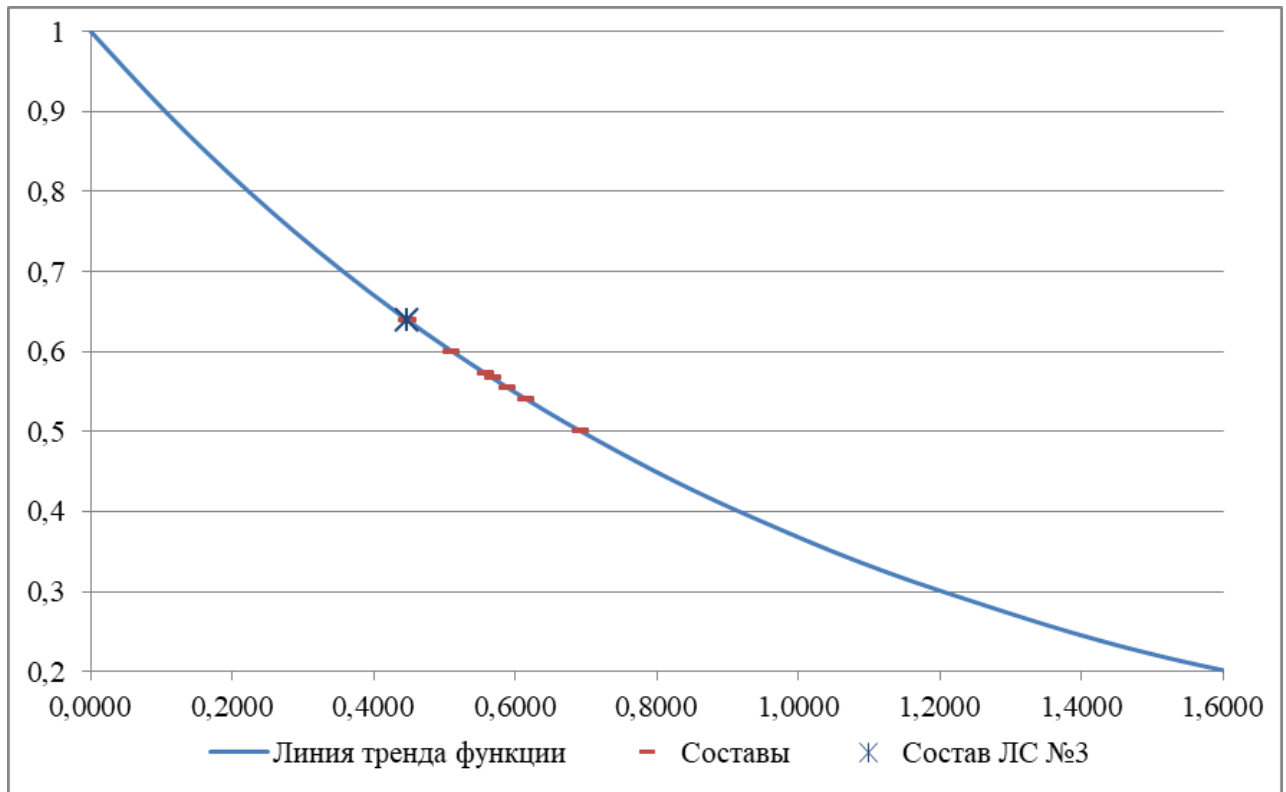


Рисунок 3.14 – Визуализация результатов функции желательности Харрингтона

Рисунок 3.14. отражает взаимосвязь качественных характеристик состава от суммарного отклика каждого фактора. Для оценки следует применять критерий, описанный в главе 2: «Чем больше отклик, тем лучше состав». Отклики функций для составов получены в узком диапазоне значений, что говорит о правильном подходе к разработке или о малой вариабельности составов ЛФ. Все составы на основе аскорбата хитозана 500 кДа обладают более низким откликом в сравнении с аналогичными составами на основе аскорбата хитозана 200 кДа. Поэтому данные составы не подходят для дальнейшей разработки ЛС.

Для выбора оптимального состава использование функции желательности Харрингтона оказалось недостаточным для визуализации результатов исследования. Поэтому было решено на основе функции желательности построить проектное поле «рабочего окна разработки» [48], которое представлено в разделе 2.5.5. Однако данное проектное поле обладает очень широким диапазоном определения значений. Для лучшей визуализации полученных результатов выбора оптимального состава было решено взять узкий диапазон проектного поля для построения данной функции. Результаты построения и отклики составов представлены на Рисунках 3.15. и 3.16.

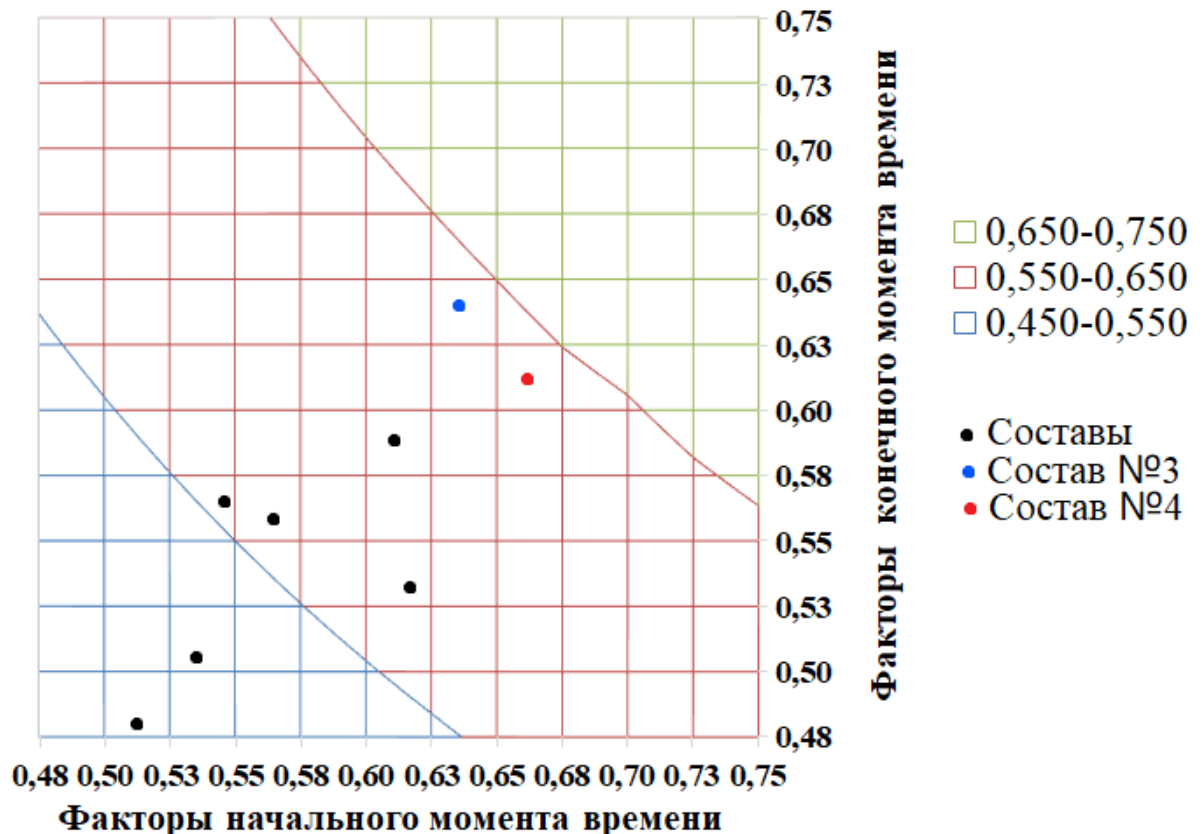


Рисунок 3.15 – Двухмерная визуализация проектного поля «рабочего окна разработки»

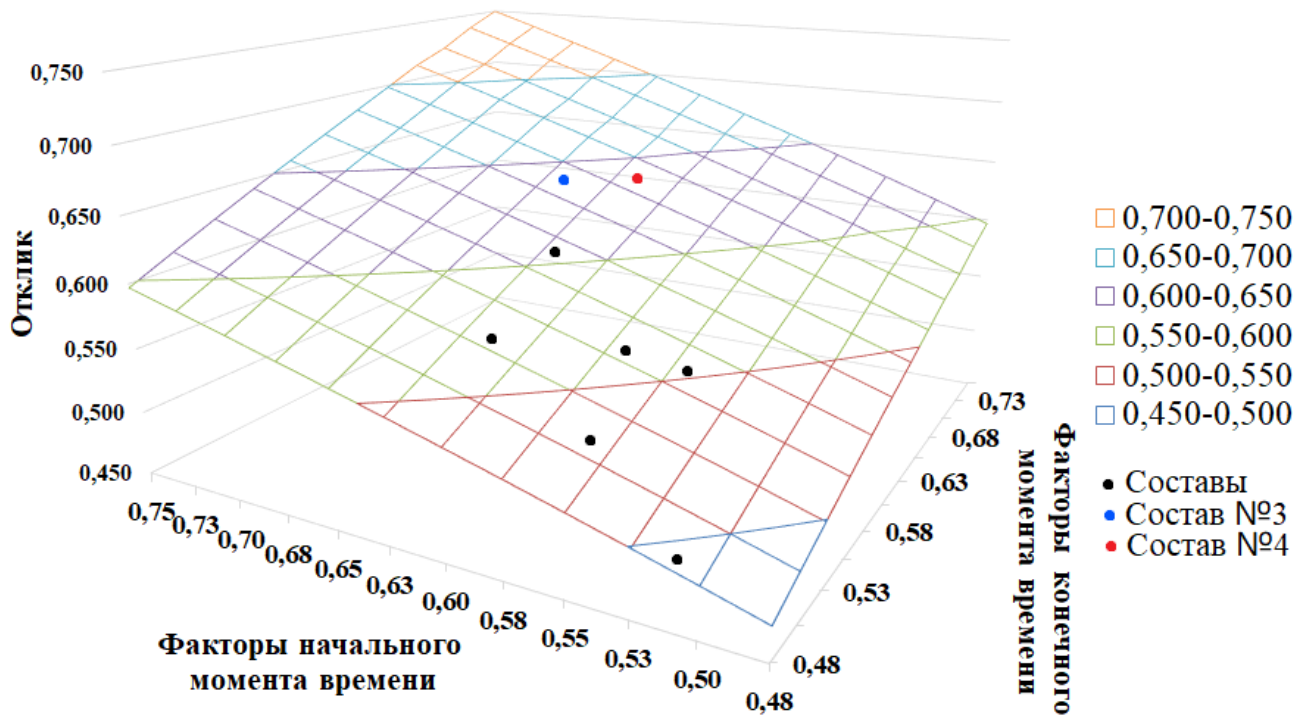


Рисунок 3.16 – Трехмерная визуализация проектного поля «рабочего окна разработки»

Как видно из Рисунков 3.15 и 3.16. и следуя принципам, которые описаны в разделе 2.5.5, для выбора оптимального состава требуется в первую очередь выбрать точки расположенные ближе к 1. Откликами отвечающими данным требованиям являлись составы №3 и №4. Для осуществления выбора требуется оценить какой отклик состава по значениям находится ближе к центру функции, такой точкой на графике является отклик состава №3.

Согласно Рисункам 3.14, 3.15, 3.16. и Таблице 3.29. наибольшим откликом при построении функции желательности Харрингтона и проектного поля «рабочего окна разработки» обладает состав ЛС №3, что служит основанием для осуществления выбора этого состава в качестве ЛС для дальнейшей разработки технологии и проведения теста на стабильность. Состав ЛС №4 не сильно отличается по отклику функции, однако при детальном обзоре результатов анализа видно, что в конечный момент времени (в фазу пролонгации) состав данного ЛС обладает более низкими показателями, чем состав №3 и его значения находятся ближе к №2.

Таким образом было выбрано ЛС №3 для дальнейшего проведения исследований, в состав которого входили аскорбат хитозана с молекулярной массой 200 кДа и содержанием кремния диоксида 2 % от массы ЛФ.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

В результате исследований осуществлен выбор оптимального носителя, установлены физико-химические характеристики для дальнейшей разработки состава ЛС.

При помощи определения фармацевтико-технологических и биофармацевтических свойств экспериментально исследовано влияние состава на качество ЛС. Проведены исследования по изучению влияния амилолитического фермента на хитозановый полимер.

Исследованные фармацевтико-технологические характеристики: насыпная плотность, сыпучесть, а также биофармацевтические факторы: высвобождение ферментативных ЛС, позволили осуществить многофакторный анализ на основе функции желательности Харрингтона для выбора оптимального состава ЛС.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «ПОРОШОК БИОРАЗЛАГАЕМЫЙ ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ»

Высокие требования к качеству ЛС закладываются в процессе разработки технологии получения лекарственной формы, критерием оценки которых является анализ критических контрольных точек производства, включающий контроль химических (Кх), технологических (Кт) и микробиологических (Км) показателей, интервалы которых закладываются на стадии разработки ЛС. [29]. Чтобы соответствовать всем требованиям качества необходимо точное описание всех технологических процессов и методик анализа на конкретное ЛС. Для описания процесса получения была составлена технологическая схема производства лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

4.1. Исследования микробиологической чистоты лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Перед началом разработки технологических процессов получения ЛС требуется проведение исследования на микробиологическую чистоту ЛФ. Так как по требованию ГФ РФ XIV ОФС 1.4.1.0010.15 «Порошки» лекарственное средство для наружного применения должно быть стерильным, поэтому при проведении контроля качества необходимо проводить исследование на микробиологическую чистоту и стерильность [10]. А также все технологические процессы получения ЛС должны проходить в условиях асептики или с последующей радиационной стерилизацией.

Образцы ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения», которые приготовлены в асептических условиях, были приняты в качестве аналитических образцов. Далее аналитические образцы ЛС готовили в виде раствора следующим образом: аналитический образец вскрывали в асептических условиях и брали точную навеску в количестве 0,5 г. Затем точную навеску переносили в предварительно подготовленный стерильный растворитель, в качестве которого выступал фосфатный буферный раствор. Объем колбы доводили до 90 мл стерильным фосфатным буфером. Раствор осторожно перемешивали до образования гомогенного состояния. Далее приготовленный раствор переносили на предварительно приготовленные стерильные питательные среды для определения микробиологической чистоты [48, 70]. Оценка показателя качества «Микробиологическая чистота» ЛФ проводилась как сразу после изготовления ЛФ, так и по истечению года хранения при температуре не более 20 °С [48, 70]. Определение показателя качества «Микробиологическая чистота» ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» отражено в Таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Определение показателя качества «Микробиологическая чистота» ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Серия №	Определение количества аэробных бактерий в 1,0 г пробы			Определение общего числа грибов в 1,0 г пробы	Определение E. coli в 1,0 г пробы			
	Количества выросших аэробных бактерий при разведении				Число бактерий в 1,0 г	Количество грибковых колоний при разведении		Количество грибов в пробе 1,0 г
	1:10	1:100	1:1000			1:10	1:100	
Микробиологическая чистота порошка после изготовления								
1	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
2	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
3	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
4	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
5	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
6	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
7	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
8	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
9	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
10	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
Среднее значение	-	-	-	отриц.	-	-	-	

Продолжение Таблицы 4.1

Серия №	Определение количества аэробных бактерий в 1,0 г пробы			Число бактерий в 1,0 г	Определение общего числа грибов в 1,0 г пробы			Определение E. coli в 1,0 г пробы
	Количества выросших аэробных бактерий при разведении				Количество грибковых колоний при разведении		Количество грибов в пробе 1,0 г	
	1:10	1:100	1:1000		1:10	1:100		
Микробиологическая чистота порошка после изготовления								
1	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
2	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
3	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
4	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
5	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
6	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
7	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
8	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
9	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
10	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
Среднее значение	-	-	-	отриц.	-	-	-	

Продолжение Таблицы 4.1

Серия №	Определение количества аэробных бактерий в 1,0 г пробы				Определение общего числа грибов в 1,0 г пробы			Определение E. coli в 1,0 г пробы
	Количества выросших аэробных бактерий при разведении			Число бактерий в 1,0 г	Количество грибковых колоний при разведении		Количество грибов в пробе 1,0 г	
	1:10	1:100	1:1000		1:10	1:100		
Микробиологическая чистота порошка после изготовления								
1	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
2	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
3	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
4	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
5	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
6	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
7	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
8	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
9	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
10	-	-	-	отриц.	-	-	-	отриц.
Среднее значение	-	-	-	отриц.	-	-	-	

Результаты проведенных исследований по показателю контроля качества «Микробиологическая чистота» ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» отвечают требованиям, предъявляемым ГФ РФ XIV – роста микрофлоры на стерильных питательных средах не обнаружено, общее число аэробных бактерий и грибковых микроорганизмов в 1,0 г ЛС составляет 0,0 что соответствует требованиям ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» категории стерильные ЛС. Все испытания проведены в соответствии с ГФ РФ XIV ОФС 1.2.4.0003.15 «Стерильность».

4.2. Разработка и описание технологической схемы производства лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Технология получения лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения» состояла из подготовительных операций, производственно-технологических операций получения носителя и ЛС, а также процессов упаковки и маркировки. Подготовительный процесс состоял из трех последовательно идущих подготовительных этапов:

- ВР.1 Получение воды очищенной и воды для инъекций
- ВР.2 Подготовка производства
- ВР.3 Подготовка компонентов и материалов

Производственно-технологический процесс получения лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения» состоял из следующих этапов:

- ТП.4 Получение раствора носителя
- ТП.5 Получение носителя акробата хитозана в форме порошка
- ТП.6 Получение лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

И последний технологический процесс упаковки, выделенный в отдельную стадию:

- УМО.5 Фасовка и упаковка

Описание процессов и соответствующих подстадий

ВР.1 Получение воды очищенной и воды для инъекций: на данной стадии получают воду очищенную путем фильтрования и дистилляции из питьевой воды. На этом же этапе получают воду для инъекций путем многоступенчатой дистилляции из воды очищенной.

ВР.2 Подготовка производства: на данном этапе осуществляется приготовление дезинфицирующего раствора для обработки оборудования и помещений на основе пероксида водорода и моющего средства, и готовится дезинфицирующий раствор для рук на основе дегмина. Также на данном этапе осуществляется подготовка персонала. Персонал обязан

соблюдать нормы СанПиН [2] и правила, установленные производством. Также проводится подготовка оборудования и помещений к производству путем осуществления процессов дезинфекции и технологической настройки оборудования. При необходимости проводят техническое обслуживание оборудования. Подготовка воздуха заключается в осуществлении очистки и подготовки воздуха в производственных помещениях. При необходимости перед началом производства меняют воздушные фильтры в системе притока и оттока воздуха.

ВР.3 Подготовка компонентов и материалов: на данной стадии подготавливают исходное сырье и материалы необходимые для производственного цикла получения носителя аскорбата хитозана и лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения». Этот подготовительный этап состоит из 2 стадий.

– *ВР.3.1 Взвешивание сырья:* осуществляется отвешивание аскорбиновой кислоты, хитозана, химопсина, гиалуронидаза, аэросила и производится контроль качества сырья.

– *ВР.3.2 Приготовление растворов:* осуществляется приготовление 20 % раствора аскорбиновой кислоты, а также отбор аликвотного объема для растворения хитозана.

ТП.4 Получение раствора аскорбата хитозана: на данной стадии технологического процесса происходит получение раствора аскорбата хитозана из компонентов сырья, предназначенных для производства (хитозана пищевого и 20 % раствора аскорбиновой кислоты), фильтрация от крупных механических частиц и упаковка в тару для замораживания. Данный технологический процесс состоит из трех последовательных этапов:

– *ТП.4.1 Гелеобразование:* осуществляется получение раствора хитозана по следующей методике: точную навеску хитозана помещают в колбу для смешивания, добавляют 15 % от общего объема 20 % аскорбиновой кислоты, перемешивают при помощи верхнелопастной мешалки на низкой скорости, до образования плотного геля и разбавляют. Полученную массу доводят оставшимся количеством воды, перемешивают при помощи верхнелопастной мешалки на высокой скорости 30 секунд и оставляют перемешиваться на низкой скорости до полного растворения.

– *ТП.4.2 Фильтрование раствора:* осуществляется очистка полученного раствора через мембранный фильтр с диаметром пор 500 мкм.

ТП.5 Получение носителя: происходит подготовка и сублимационная сушка полученного раствора аскорбата хитозана и последующее доведение лиофилизата стандартным требованиям, заложенным на стадии разработки, для дальнейшего применения вспомогательного (биоразлагаемого) компонента аскорбата хитозана для получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения». Данный технологический процесс состоит из четырех последовательных этапов:

- *ТП.5.1 Замораживание аскорбата хитозана:* осуществляется заморозка раствора аскорбата хитозана в морозильной камере при минус 80,0 °С в течение 2 часов.
- *ТП.5.2 Сублимационная сушка аскорбата хитозана:* осуществляется сублимационная сушка аскорбата хитозана в условиях глубокого вакуума. Основные параметры технологии получения лиофилизата аскорбата хитозана указаны в Таблице 4.1.

Таблица 4.2 – Основные параметры технологии получения лиофилизата

Параметр	Значение
Режим сушки	0,016 мбар
Режим досушивания	0,085 мбар
Температура конденсатора	- 80,0 °С
Время сушки	40 ч
Время досушивания	8 ч

- *ТП.5.3 Измельчение:* осуществляется измельчение лиофильной массы до однородного порошка.
- *ТП.5.4 Фракционирование:* осуществляется просеивание и фракционирование при помощи ситового анализа. Ситовой анализ проводился при помощи способности фракции лиофилизата аскорбата хитозана проходить через сито 160 мкм. Фракцию, не прошедшую через данное сито, подвергают дополнительному измельчению и фракционированию.

ТП.6 Получение лекарственного средства: происходит получение лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

УМО.7 Фасовка и упаковка: происходит фасовка и маркировка лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения». Для осуществления выбора упаковочного материала были рассмотрены следующие их типы, применяемые в фармацевтической практике: стеклянный и полиэтиленовый пластиковый флаконы. Стекло является более индифферентным материалом в сравнении с полиэтиленовым пластиком (ПЭП). Однако существенным недостатком стеклянной тары является неудобство транспортировки и неэластичность упаковки, что затрудняет использование лекарственного средства. Также нужно учесть, что упаковка из ПЭП будет дешевле и проще в производстве, чем стеклянная упаковка. На флакон было решено установить дозатор, обеспечивающий точность дозирования высокоактивных действующих веществ, представленных ферментами: химопсином и гиалуронизой, которые при большой дозировке могут вызвать побочные эффекты, связанные с образованием язв. Схематичный рисунок упаковки представлен на Рисунке 4.1. Технологическая схема процесса производства ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» представлен на Рисунке 4.2.

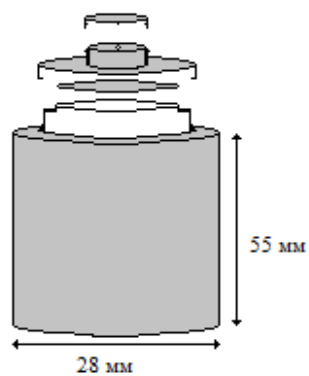


Рисунок 4.1 – Схематичный Рисунок упаковки лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Перечень важнейших контрольных точек производства лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения» для контроля сырья, полупродукта и конечного продукта, обеспечивающих соблюдение установленного технологического процесса приведен в Таблице 4.3.

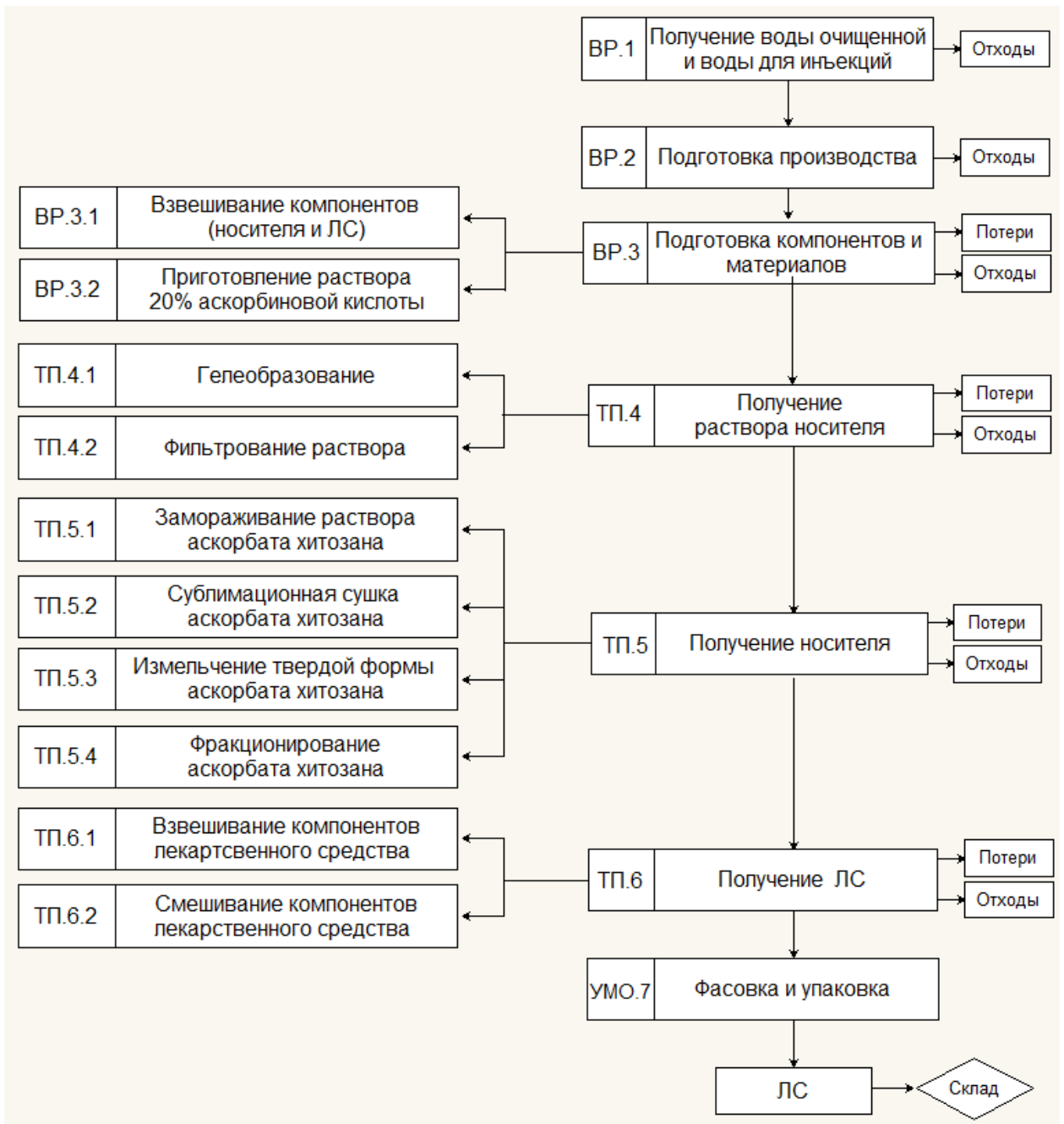


Рисунок 4.2 – Технологическая схема производства лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Таблица 4.3 – Перечень контрольных точек получения лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Шифр стадии, операции	Обозначение контрольной точки	Критические контрольные точки	Критерий приемлемости	
1	2	3	4	
ВР.1.	Кт*	Производственный контроль получения воды очищенной и воды для инъекций	Критерии приемлемости показателей качества согласно ФС.2.2.0019.18 «Вода для инъекций»	
	Км**	Контроль микробиологической контаминации воды для инъекций		
ВР.2.	Км	Контроль микробиологической контаминации воздуха рабочей зоны, технологической поверхности оборудования, инвентаря, одежды персонала	Класс чистоты: «В» – не более 5 КОЕ/м ³ /пластина Рекомендуемый предел микробной контаминации для одежды и перчаток не более 5 КОЕ/перчатка	
ВР.3.	Кт, Кх***, Км	Входной контроль сырья на соответствие показателям спецификации	Соответствие показателям спецификации на конкретное сырье или продукт	
ТП.4.	Кт	Получение раствора аскорбата хитозана	Масса раствора	Согласно производственной рецептуре
			Температура среды	20 – 25 °С
			Скорость вращения мешалок Этап 1: Этап 2: Этап 3:	300 – 350 об/мин 1500 – 2000 об/мин 100 – 150 об/мин
			Время Этап 1: Этап 2: Этап 3:	1 – 2 минут 0,5 – 1 минут 100 – 120 минут
			Тип фильтра (размер пор, мкм)	Сетчатый фильтр (500 мкм)

Продолжение Таблицы 4.3

	Кх		Контроль рН	5,58
ТП.5	Кт	Получение лиофилизата	Замораживание	- 80 °С
			Время замораживания	120 мин
			Вакуум Этап 1: Этап 2:	0,016 мбар 0,085 мбар
			Температура конденсатора	- 80 °С
			Время Этап 1: Этап 2:	40 ч 8 ч
			Скорость вращения лопасти измельчителя	18000 об/мин
			Размер фракции	Не более 160 мкм
			Кх	Контрольный анализ полупродукта
			Качественная реакция на аскорбиновую кислоту	Положительная реакция
			Описание	Порошок от белого до белого со слегка желтоватым оттенком цвета, со слабым характерным запахом

Продолжение Таблицы 4.3

	Км	Микробиологическая контаминация полупродукта	Лекарственное средство должно быть стерильным, согласно требованиям ГФ РФ XIV ОФС.1.4.1.0010.15 «Порошки» и ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» Категория 1	
ТП.6	Кт	Получение лекарственного средства	Скорость вращения лопасти измельчителя:	10000 об/мин
			Размер фракции активных и вспомогательных веществ:	Не более 160 мкм (120 – 140 мкм)
			Взвешивание компонентов:	Согласно рецептуре лекарственного средства
			Скорость вращения смесителя:	60 – 80 об/мин
			Время:	40 – 60 мин
			Размер фракции лекарственного средства	Не более 160 мкм
	Км	Микробиологическая контаминация полупродукта	Лекарственное средство должно быть стерильным, согласно требованиям ГФ РФ XIV ОФС.1.4.1.0010.15 «Порошки» и ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» Категория 1	

Продолжение Таблицы 4.3

ТП.6	Кх	Контрольный анализ полупродукта	Качественная реакция на хитозан	Положительная реакция
			Качественная реакция на аскорбиновую кислоту	Положительная реакция
			Ферментативная активность: Протеолитическая активность Амилолитическая активность	На 131 мг лекарственного средства (1 доза). 20 МЕ 640 МЕ
			Описание	Порошок от белого до белого со слегка желтоватым оттенком цвета, со слабым характерным запахом
УМО.7	Кт	Контроль упаковки	Масса содержимого 1 упаковки	10,00±0,50 г
			Контроль упаковки	Контроль этикетки первичной упаковки
	Контроль маркировки вторичной упаковки			
Контроль содержания инструкции по применению				

Продолжение Таблицы 4.3

УМО.7	Кх	Контроль содержимого упаковки	Описание	Порошок от белого до белого со слегка желтоватым оттенком цвета, со слабым характерным запахом
			Качественная реакция на хитозан	Положительная реакция
			Качественная реакция на аскорбиновую кислоту	Положительная реакция
			Ферментативная активность: Протеолитическая активность Амилолитическая активность	На 131 мг лекарственного средства (1 дозы). 20 МЕ 640 МЕ

Примечания: Кт^{*} – точка технологического контроля, Км^{**} – точка микробиологического контроля, Кх^{***} – точка химического контроля.

4.3. Исследование влияния условий и сроков хранения лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Определение стабильности в процессе хранения является одним из важных этапов разработки лекарственных средств. Многочисленные исследования по изучению ЛФ свидетельствуют об изменении показателя стабильности за счет влияния физических, химических, микробиологических, факторов, которые находятся в различных зависимостях от условий хранения и упаковки ЛФ.

Согласно требованиям Решения Коллегии ЕЭК от 10.05.2018 № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций», ГФ РФ ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» и ГОСТ Р 57129-2016 «Лекарственные средства для медицинского применения. Изучение стабильности новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Общие положения» для изучения стабильности ЛС для наружного применения требуется кроме метода ускоренного старения также метод долгосрочного испытания стабильности [3, 10, 27, 28, 30].

Согласно спецификациям, полученным от производителя ферментативных ФС, температура хранения у гиалуронидазы составляет до 15 °С со сроком годности в 3 год, а у химопсина температура хранения составляет до 20 °С со сроком годности в 3 год.

То есть верхний предел температуры метода долгосрочного испытания стабильности должен находиться на отметке в 15 °С при условиях хранения препарата гиалуронидазы, тогда возможно уложиться в указанный срок годности. Однако потребительское хранение порошков для наружного применения редко будет соблюдать эти рамки, поэтому было решено провести исследования стабильности при комнатной температуре (до 25 °С). Для полноты исследования было решено проводить изучение стабильности ЛС при условии хранения образцов в холодильнике, то есть в диапазоне температур от 2 до 8 °С.

Для анализа влияния условий хранения на качество ЛС были использованы 3 серии по 25 флаконов полиэтиленового пластика (ПЭ) ЛС «Порошок, для наружного применения» с массой содержимого 10 г:

- Серия № 3011501 с датой производства и упаковки 15.01.2020 г. в количестве 25 флаконов лекарственного средства с массой содержимого упаковки 10 грамм.
- Серия № 3021601 с датой производства и упаковки 16.01.2020 г. в количестве 25 флаконов лекарственного средства с массой содержимого упаковки 10 грамм.
- Серия № 3031701 с датой производства и упаковки 17.01.2020 г. в количестве 25 флаконов лекарственного средства с массой содержимого упаковки 10 грамм.

Критерии контроля качества ЛС представлены в Таблице 4.4 Все исследования проводились согласно ГФ РФ XIV [111], Фармакопеи ЕАЭС [23], и были использованы для разработки спецификации на ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

Таблица 4.4 – Критерии исследования сроков годности и стабильности лекарственного средства с их характеристикой.

Критерий	Характеристика
Описание	Порошок от белого до белого со слегка желтоватым оттенком цвета, со слабым характерным запахом
Размер частиц	Не более 160 мкм
Потеря массы при высушивании	Определение показателя влажности, который должен составлять 0,30 ± 0,1
Подлинность	ЛС должно давать положительные реакции на хитозан и аскорбиновую кислоту
Микробиологическая чистота	В соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002.18 Лекарственное средство должно быть стерильным
Ферментативная активность: Протеолитическая активность Амилолитическая активность	В расчете на 131 миллиграмм лекарственного средства (1 дозы). 20 МЕ 640 МЕ
Точность дозирования в упаковку	Точность дозирования должна быть в пределах от 9,50 до 10,50
Насыпная плотность	Значение 257,0±1,5 %

Для изучения стабильности при комнатной температуре ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» помещали в климатическую камеру Memmert HPP110 (Германия), квалифицированную в соответствии с требованиями, представленными в ICH Q1A «Испытание новых лекарственных веществ и препаратов на стабильность» [136].

Для изучения стабильности в диапазоне температур от 2 до 8 °С ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» помещали в холодильную камеру POZIS RK-103 (Россия), квалифицированную в соответствии с требованиями, представленными в ICH Q1A «Испытание новых лекарственных веществ и препаратов на стабильность».

Образцы ЛС, находящиеся на исследовании стабильности, подлежали проверке по показателям качества проекта спецификации в установленные сроки, согласно ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» [10]:

- в течение первого года хранения – через каждые 3 месяца;
- в течение второго и третьего года хранения – через каждые 6 месяцев;
- после третьего года хранения – через каждые 12 месяцев.

Результаты исследования стабильности образцов ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» серий № 3011501, 3021601, 3031701 представлены в Таблицах 4.5. - 4.10. Статистический анализ образцов ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» серий № 3011501, 3021601, 3031701 при различных условиях хранения представлен в Таблицах 4.11. - 4.13.

Таблица 4.5 –Результаты исследования стабильности образцов ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

№	Серия № 3011501 от 15.01.2020 г. при температуре 21 °С и относительной влажности 45±5 %											
	Месяц											
	0				3				6			
	Критерий исследования											
	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,24	257,56	101,20	99,61	0,27	255,62	98,72	99,31	0,35	258,51	98,90	98,89
2	0,20	259,00	101,99	99,79	0,24	256,42	99,58	99,46	0,21	256,99	98,04	98,62
3	0,23	257,56	99,98	99,94	0,27	257,82	99,96	99,11	0,25	260,48	98,68	98,56
4	0,21	256,88	100,26	99,98	0,24	259,78	99,89	99,04	0,20	260,51	98,12	98,52
5	0,30	260,03	100,42	100,00	0,32	258,10	98,63	99,21	0,27	258,53	98,44	98,60
6	0,22	257,50	101,69	99,56	0,29	257,88	99,94	99,35	0,36	255,75	98,56	98,97
Метрологические измерения												
\bar{X}	0,23	258,09	100,92	99,81	0,27	257,60	99,45	99,25	0,27	258,46	98,46	98,69
S^2_x	$1,27 \times 10^{-3}$	1,39	$6,77 \times 10^{-1}$	$3,69 \times 10^{-2}$	$9,37 \times 10^{-4}$	2,09	$3,83 \times 10^{-1}$	$2,46 \times 10^{-2}$	$4,67 \times 10^{-3}$	3,56	$1,09 \times 10^{-1}$	$3,54 \times 10^{-2}$
CO	0,04	1,18	0,82	0,19	0,03	1,45	0,62	0,16	0,07	1,89	0,33	0,19
RSD	15,25	0,46	0,82	0,19	11,27	0,56	0,62	0,16	24,99	0,73	0,34	0,19
№	Месяц											
	9				12				18			
	Критерий исследования											
		ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА
1	0,37	259,50	97,43	98,08	0,34	259,61	97,30	97,25	0,31	257,88	96,36	96,48
2	0,28	260,78	98,43	98,12	0,26	258,97	97,38	97,89	0,25	257,40	95,86	96,27
3	0,25	255,42	98,11	98,18	0,36	256,25	97,06	97,46	0,23	259,31	96,12	96,08
4	0,21	258,61	98,30	98,01	0,39	258,46	97,22	97,95	0,35	260,53	96,23	96,03
5	0,36	258,92	98,43	98,47	0,31	259,30	96,99	97,42	0,38	260,53	96,19	96,08
6	0,33	257,21	98,25	98,31	0,22	255,67	97,00	97,67	0,20	255,25	95,91	96,45
Метрологические измерения												
\bar{X}	0,30	258,41	98,16	98,20	0,31	258,04	97,16	97,61	0,29	258,48	96,11	96,23
S^2_x	$4,08 \times 10^{-3}$	3,50	$1,42 \times 10^{-1}$	$2,84 \times 10^{-2}$	$4,07 \times 10^{-3}$	2,78	$2,72 \times 10^{-2}$	$7,71 \times 10^{-2}$	$5,07 \times 10^{-3}$	4,21	$3,72 \times 10^{-2}$	$3,95 \times 10^{-2}$
CO	0,06	1,87	0,38	0,17	0,06	1,67	0,16	0,28	0,07	2,05	0,19	0,20
RSD	21,29	0,72	0,38	0,17	20,35	0,65	0,17	0,28	24,83	0,79	0,20	0,21

Продолжение Таблицы 4.5

№	Серия № 3011501 от 15.01.2020 г. при температуре 21 °С и относительной влажности 45±5 %			
	Месяц			
	24			
	Критерий исследования			
	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,38	255,31	95,38	95,40
2	0,26	255,54	95,56	95,22
3	0,30	255,93	95,09	95,11
4	0,34	257,24	95,53	95,46
5	0,33	257,16	95,56	95,33
6	0,22	259,52	95,61	95,25
Метрологические измерения				
\bar{X}	0,30	258,41	98,16	98,20
S^2_x	$2,50 \times 10^{-3}$	2,42	$4,59 \times 10^{-2}$	$1,70 \times 10^{-2}$
CO	0,05	1,56	0,21	0,13
RSD	16,39	0,61	0,22	0,14

Примечания: \bar{X} – среднее значение критерия, S^2_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %, ПМВ – потеря массы при высушивании, НП – насыпная плотность, АА – амилолитическая активность, ПА – протеолитическая активность

Таблица 4.6 –Результаты исследования стабильности образцов ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

№	Серия № 3011501 от 15.01.2020 г.											
	при температуре 8 °С и относительной влажности 35±5 %											
	0				3				6			
	Критерий исследования											
	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,24	257,56	101,20	99,61	0,38	258,84	99,48	98,99	0,26	257,40	98,81	99,11
2	0,20	259,00	101,99	99,79	0,20	259,97	98,84	98,93	0,21	256,13	98,34	98,78
3	0,23	257,56	99,98	99,94	0,32	260,60	98,68	98,70	0,39	260,03	98,96	98,35
4	0,21	256,88	100,26	99,98	0,29	257,31	99,37	98,75	0,33	260,75	98,70	98,23
5	0,30	260,03	100,42	100,00	0,23	255,49	99,37	98,92	0,40	258,99	98,85	98,98
6	0,22	257,50	101,69	99,56	0,32	255,17	99,30	99,34	0,39	259,96	98,88	99,02
Метрологические измерения												
\bar{X}	0,23	258,09	100,92	99,81	0,29	257,90	99,17	98,94	0,33	258,88	98,76	98,75
S^2_x	$1,27 \times 10^{-3}$	1,39	$6,77 \times 10^{-1}$	$3,69 \times 10^{-2}$	$4,32 \times 10^{-3}$	5,21	$1,08 \times 10^{-1}$	$5,13 \times 10^{-2}$	$6,28 \times 10^{-3}$	3,15	$4,90 \times 10^{-2}$	$1,37 \times 10^{-2}$
CO	0,04	1,18	0,82	0,19	0,07	2,28	0,33	0,23	0,08	1,77	0,22	0,37
RSD	15,25	0,46	0,82	0,19	22,66	0,89	0,33	0,23	24,01	0,69	0,22	0,38
№	Месяц											
	9				12				18			
	Критерий исследования											
		ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА
1	0,24	257,56	101,20	99,61	0,38	258,84	99,48	98,99	0,26	257,40	98,81	99,11
2	0,20	259,00	101,99	99,79	0,20	259,97	98,84	98,93	0,21	256,13	98,34	98,78
3	0,23	257,56	99,98	99,94	0,32	260,60	98,68	98,70	0,39	260,03	98,96	98,35
4	0,21	256,88	100,26	99,98	0,29	257,31	99,37	98,75	0,33	260,75	98,70	98,23
5	0,30	260,03	100,42	100,00	0,23	255,49	99,37	98,92	0,40	258,99	98,85	98,98
6	0,22	257,50	101,69	99,56	0,32	255,17	99,30	99,34	0,39	259,96	98,88	99,02
Метрологические измерения												
\bar{X}	0,23	258,09	100,92	99,81	0,29	257,90	99,17	98,94	0,33	258,88	98,76	98,75
S^2_x	$1,34 \times 10^{-3}$	1,39	$6,77 \times 10^{-1}$	$3,69 \times 10^{-2}$	$4,32 \times 10^{-3}$	5,21	$1,08 \times 10^{-1}$	$5,13 \times 10^{-2}$	$6,28 \times 10^{-3}$	3,15	$4,90 \times 10^{-2}$	$1,37 \times 10^{-1}$
CO	0,04	1,18	0,82	0,19	0,07	2,28	0,33	0,23	0,08	1,77	0,22	0,37

Продолжение Таблицы 4.6

№	Серия № 3011501 от 15.01.2020 г. при температуре 8 °С и относительной влажности 35± 5%			
	Месяц			
	24			
	Критерий исследования			
	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,35	255,74	97,57	97,03
2	0,30	258,62	96,63	96,64
3	0,35	257,99	96,69	97,11
4	0,29	256,09	97,07	96,87
5	0,38	258,08	97,39	97,53
6	0,36	258,01	96,86	97,06
Метрологические измерения				
\bar{X}	0,34	257,42	97,04	97,04
S^2_x	$1,26 \times 10^{-3}$	1,43	$1,45 \times 10^{-1}$	$8,69 \times 10^{-2}$
CO	0,04	1,19	0,38	0,29
RSD	10,48	0,46	0,39	0,30

Примечания: \bar{X} – средние значение критерия, S^2_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %, ПМВ – потеря массы при высушивании, НП – насыпная плотность, АА – амилолитическая активность, ПА – протеолитическая активность

Таблица 4.7 –Результаты исследования стабильности образцов ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

№	Серия № 3021601 от 16.01.2020 г.												
	при температуре 21 °С и относительной влажности 45±5 %												
	Месяц												
	0				3				0				
Критерий исследования													
	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	
1	0,28	256,11	101,22	99,61	0,31	259,13	98,56	99,17	0,39	260,52	98,96	98,68	
2	0,24	259,37	99,96	99,79	0,28	256,60	98,34	99,27	0,26	256,77	98,87	98,51	
3	0,30	258,38	100,52	99,57	0,31	259,41	98,58	99,41	0,30	260,29	98,32	98,79	
4	0,26	257,57	99,36	100,00	0,32	257,06	98,25	99,50	0,21	257,87	98,67	98,69	
5	0,29	255,48	101,70	99,53	0,28	259,43	99,62	99,15	0,40	257,35	98,24	98,62	
6	0,25	258,05	101,43	99,71	0,31	256,36	98,19	99,39	0,39	258,00	98,74	98,87	
Метрологические измерения													
\bar{X}	0,27	257,49	100,70	99,70	0,30	258,00	98,59	99,32	0,33	258,47	98,63	98,69	
S^2_x	$5,60 \times 10^{-4}$	2,12	$8,36 \times 10^{-1}$	$3,04 \times 10^{-2}$	$2,97 \times 10^{-4}$	2,17	$2,80 \times 10^{-1}$	$1,98 \times 10^{-2}$	$6,43 \times 10^{-3}$	2,45	$8,57 \times 10^{-2}$	$1,59 \times 10^{-2}$	
CO	0,02	1,46	0,91	0,17	0,02	1,47	0,53	0,14	0,08	1,56	0,29	0,13	
RSD	8,76	0,57	0,91	0,17	5,71	0,57	0,54	0,14	24,67	0,61	0,30	0,13	
№	Месяц												
	9				12				9				
	Критерий исследования												
		ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,29	259,13	97,66	98,21	0,37	256,27	97,37	97,77	0,29	255,60	96,44	96,48	
2	0,25	259,97	97,17	98,48	0,21	256,01	96,96	97,57	0,21	258,53	95,92	96,08	
3	0,29	256,24	98,16	98,30	0,31	260,56	96,76	97,32	0,29	257,57	96,08	96,04	
4	0,37	255,58	97,69	98,37	0,27	256,44	97,19	97,66	0,20	258,23	96,37	96,03	
5	0,39	257,38	97,78	98,03	0,29	260,52	97,02	97,14	0,37	259,38	96,33	96,42	
6	0,27	260,63	97,90	98,05	0,34	260,53	97,12	97,22	0,34	257,21	95,74	96,21	
Метрологические измерения													
\bar{X}	0,31	258,16	97,73	98,24	0,30	258,39	97,07	97,45	0,28	257,75	96,15	96,21	
S^2_x	$3,20 \times 10^{-3}$	4,25	$1,07 \times 10^{-1}$	$3,18 \times 10^{-2}$	$3,14 \times 10^{-3}$	5,56	$4,35 \times 10^{-2}$	$6,53 \times 10^{-2}$	$4,63 \times 10^{-3}$	1,69	$7,81 \times 10^{-2}$	$3,90 \times 10^{-2}$	
CO	0,06	2,06	0,33	0,18	0,06	2,36	0,21	0,26	0,07	1,30	0,28	0,20	
RSD	18,25	0,80	0,34	0,18	18,77	0,91	0,21	0,26	24,01	0,50	0,29	0,21	

Продолжение Таблицы 4.7

№	Серия № 3021601 от 16.01.2020 г. при температуре 21 °С и относительной влажности 45±5 %			
	Месяц			
	24			
	Критерий исследования			
	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,32	0,32	0,32	0,32
2	0,21	0,21	0,21	0,21
3	0,27	0,27	0,27	0,27
4	0,31	0,31	0,31	0,31
5	0,39	0,39	0,39	0,39
6	0,28	0,28	0,28	0,28
Метрологические измерения				
\bar{X}	0,30	0,30	0,30	0,30
S^2_x	$3,59 \times 10^{-3}$	$3,59 \times 10^{-3}$	$3,59 \times 10^{-3}$	$3,59 \times 10^{-3}$
CO	0,06	0,06	0,06	0,06
RSD	20,19	20,19	20,19	20,19

Примечания: \bar{X} – средние значение критерия, S^2_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %, ПМВ – потеря массы при высушивании, НП – насыпная плотность, АА – амилолитическая активность, ПА – протеолитическая активность

Таблица 4.8 –Результаты исследования стабильности образцов ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

№	Серия № 3021601 от 16.01.2020 г.												
	при температуре 08 °С и относительной влажности 35±5 %												
	Месяц												
	0				3				0				
Критерий исследования													
	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	
1	0,28	256,11	101,22	99,61	0,20	257,77	98,57	98,62	0,21	258,81	98,82	98,34	
2	0,24	259,37	99,96	99,79	0,32	256,48	98,73	98,99	0,38	259,06	98,86	98,38	
3	0,30	258,38	100,52	99,57	0,39	257,26	98,60	98,74	0,35	256,06	99,17	99,02	
4	0,26	257,57	99,36	100,00	0,26	259,86	99,20	98,62	0,38	259,19	99,01	98,39	
5	0,29	255,48	101,70	99,53	0,21	260,07	99,05	99,45	0,22	255,20	98,50	98,90	
6	0,25	258,05	101,43	99,71	0,38	256,80	98,66	99,42	0,27	256,66	98,42	98,82	
Метрологические измерения													
\bar{X}	0,27	257,49	100,70	99,70	0,29	258,04	98,80	98,97	0,30	257,50	98,80	98,64	
S^2_x	$5,60 \times 10^{-4}$	2,12	$8,36 \times 10^{-1}$	$3,04 \times 10^{-2}$	$6,87 \times 10^{-3}$	2,42	$6,80 \times 10^{-2}$	$1,46 \times 10^{-1}$	$6,14 \times 10^{-3}$	3,01	$8,39 \times 10^{-2}$	$9,29 \times 10^{-2}$	
CO	0,02	1,46	0,91	0,17	0,08	1,55	0,26	0,38	0,08	1,74	0,29	0,30	
RSD	8,76	0,57	0,91	0,17	28,25	0,60	0,26	0,39	25,97	0,67	0,29	0,31	
№	Месяц												
	9				12				9				
	Критерий исследования												
		ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,21	258,39	98,89	98,25	0,24	257,12	97,65	98,30	0,26	258,57	97,52	97,20	
2	0,34	256,52	98,45	98,25	0,32	255,56	98,27	98,28	0,34	256,44	97,88	97,58	
3	0,22	259,00	98,26	98,94	0,22	256,53	98,39	98,02	0,35	258,73	97,93	97,93	
4	0,28	255,86	98,94	98,52	0,34	255,65	98,32	98,32	0,39	255,92	97,03	97,59	
5	0,37	260,62	98,55	98,45	0,32	259,81	97,94	97,56	0,21	256,61	97,39	97,57	
6	0,39	256,15	98,37	98,33	0,26	259,74	98,02	97,73	0,32	256,92	97,53	97,31	
Метрологические измерения													
\bar{X}	0,30	257,76	98,58	98,46	0,28	257,40	98,10	98,04	0,31	257,20	97,55	97,53	
S^2_x	$5,90 \times 10^{-3}$	3,57	$7,80 \times 10^{-2}$	$6,78 \times 10^{-2}$	$2,47 \times 10^{-3}$	3,71	$7,92 \times 10^{-2}$	$1,06 \times 10^{-1}$	$4,30 \times 10^{-3}$	1,37	$1,10 \times 10^{-1}$	$6,50 \times 10^{-2}$	
CO	0,08	1,89	0,28	0,26	0,05	1,93	0,28	0,33	0,07	1,17	0,33	0,25	
RSD	25,46	0,73	0,28	0,26	17,53	0,75	0,29	0,33	21,03	0,46	0,34	0,26	

Продолжение Таблицы 4.8

№	Серия № 3021601 от 16.01.2020 г. при температуре 08 °С и относительной влажности 35±5 %			
	Месяц			
	24			
	Критерий исследования			
	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,30	258,46	96,60	96,91
2	0,35	257,14	97,48	96,85
3	0,29	260,35	97,54	96,61
4	0,27	257,48	97,35	96,73
5	0,20	258,09	96,99	97,25
6	0,28	258,97	97,33	96,88
Метрологические измерения				
\bar{X}	0,28	258,42	97,22	96,87
S^2_x	$2,38 \times 10^{-3}$	1,33	$1,27 \times 10^{-1}$	$4,67 \times 10^{-2}$
CO	0,05	1,15	0,36	0,22
RSD	17,31	0,45	0,37	0,22

Примечания: \bar{X} – средние значение критерия, S^2_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %, ПМВ – потеря массы при высушивании, НП – насыпная плотность, АА – амилолитическая активность, ПА – протеолитическая активность

Таблица 4.9 –Результаты исследования стабильности образцов ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

№	Серия № 3031701 от 17.01.2020 г. при температуре 21 °С и относительной влажности 45±5 %											
	Месяц											
	0				3				6			
	Критерий исследования											
	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,22	260,69	99,07	99,61	0,24	258,99	98,98	99,06	0,26	258,10	98,44	98,51
2	0,29	258,48	100,86	99,79	0,28	258,29	99,79	99,46	0,30	260,36	98,53	98,75
3	0,20	258,91	101,96	99,57	0,21	255,53	98,52	99,37	0,28	255,60	98,81	98,79
4	0,26	258,25	100,55	99,54	0,28	259,15	98,95	99,29	0,39	255,58	98,17	98,65
5	0,28	257,03	100,23	99,70	0,31	260,48	98,74	99,36	0,21	255,36	98,93	98,93
6	0,27	258,84	101,85	99,86	0,28	256,34	98,24	99,02	0,32	259,11	98,48	98,98
Метрологические измерения												
\bar{X}	0,25	258,70	100,75	99,68	0,27	258,13	98,87	99,26	0,29	257,35	98,56	98,77
S^2_x	$1,27 \times 10^{-3}$	1,41	1,61	$1,63 \times 10^{-2}$	$1,27 \times 10^{-3}$	3,46	$2,80 \times 10^{-1}$	$3,21 \times 10^{-2}$	$3,67 \times 10^{-3}$	4,58	$7,46 \times 10^{-2}$	$3,05 \times 10^{-2}$
CO	0,04	1,19	1,08	0,13	0,04	1,86	0,53	0,18	0,06	2,14	0,27	0,17
RSD	14,05	0,46	1,07	0,13	13,35	0,72	0,54	0,18	20,64	0,83	0,28	0,18
№	Месяц											
	9				12				18			
	Критерий исследования											
		ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА
1	0,37	256,57	97,09	98,24	0,26	255,73	96,80	97,28	0,29	257,47	95,76	96,19
2	0,21	255,61	97,15	98,43	0,27	259,17	97,48	97,92	0,21	260,45	95,57	96,48
3	0,31	259,55	98,50	98,01	0,31	258,89	96,98	97,17	0,20	259,98	96,11	96,50
4	0,27	255,46	97,00	98,33	0,21	255,16	96,59	97,98	0,37	260,56	96,19	96,27
5	0,25	259,71	97,56	98,06	0,20	256,53	96,93	97,70	0,34	256,43	96,43	96,32
6	0,29	259,35	97,08	98,50	0,33	256,51	96,88	97,74	0,25	259,93	96,36	96,08
Метрологические измерения												
\bar{X}	0,28	257,71	97,40	98,26	0,26	257,00	96,94	97,63	0,28	259,14	96,07	96,31
S^2_x	$2,99 \times 10^{-3}$	4,17	$3,31 \times 10^{-1}$	$3,89 \times 10^{-2}$	$2,71 \times 10^{-3}$	2,75	$8,78 \times 10^{-2}$	$1,12 \times 10^{-1}$	$4,79 \times 10^{-3}$	3,04	$1,15 \times 10^{-1}$	$2,68 \times 10^{-2}$
CO	0,05	2,04	0,58	0,20	0,05	1,66	0,30	0,33	0,07	1,74	0,34	0,16
RSD	19,29	0,79	0,59	0,20	19,76	0,65	0,31	0,34	25,01	0,67	0,35	0,17

Продолжение Таблицы 4.9

№	Серия № 3031701 от 17.01.2020 г. при температуре 21 °С и относительной влажности 45±5 %			
	Месяц			
	24			
	Критерий исследования			
	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,35	255,18	95,73	95,08
2	0,30	255,84	95,69	95,32
3	0,36	258,02	95,79	95,13
4	0,29	258,81	95,32	95,02
5	0,32	256,19	95,10	95,21
6	0,28	258,70	95,70	95,14
Метрологические измерения				
\bar{X}	0,32	257,12	95,56	95,15
S^2_x	$1,07 \times 10^{-3}$	2,49	$7,75 \times 10^{-2}$	$1,10 \times 10^{-2}$
CO	0,03	1,58	0,28	0,10
RSD	10,31	0,61	0,29	0,11

Примечания: \bar{X} – средние значение критерия, S^2_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %, ПМВ – потеря массы при высушивании, НП – насыпная плотность, АА – амилолитическая активность, ПА – протеолитическая активность

Таблица 4.10 – Результаты исследования стабильности образцов ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

№	Серия № 3031701 от 17.01.2020 г.												
	при температуре 8 °С и относительной влажности 35±5 %												
	Месяц												
	0				3				6				
Критерий исследования													
	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	
1	0,22	260,69	99,07	99,61	0,31	257,22	99,48	98,76	0,37	256,79	98,37	98,95	
2	0,29	258,48	100,86	99,79	0,29	260,27	98,87	99,32	0,28	257,66	98,36	98,68	
3	0,20	258,91	101,96	99,57	0,25	257,79	99,17	99,13	0,21	257,52	99,07	98,21	
4	0,26	258,25	100,55	99,54	0,21	259,45	98,74	99,23	0,36	256,92	98,63	98,79	
5	0,28	257,03	100,23	99,70	0,25	255,98	99,29	98,86	0,35	255,50	98,35	99,18	
6	0,27	258,84	101,85	99,86	0,32	257,40	98,59	99,09	0,21	259,98	98,99	98,74	
Метрологические измерения													
\bar{X}	0,25	258,70	100,75	99,68	0,27	258,02	99,02	99,07	0,30	257,40	98,63	98,76	
S^2_x	$1,27 \times 10^{-3}$	1,41	1,61	$1,63 \times 10^{-2}$	$1,78 \times 10^{-3}$	2,47	$1,19 \times 10^{-1}$	$4,64 \times 10^{-2}$	$5,51 \times 10^{-3}$	2,19	$1,08 \times 10^{-1}$	$1,05 \times 10^{-1}$	
CO	0,04	1,19	1,08	0,13	0,04	1,57	0,34	0,22	0,07	1,48	0,33	0,32	
RSD	14,05	0,46	1,07	0,13	15,52	0,61	0,35	0,22	25,01	0,57	0,33	0,33	
№	Месяц												
	9				12				18				
	Критерий исследования												
		ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,24	258,55	98,41	98,32	0,24	259,39	98,22	98,01	0,26	258,46	97,64	97,90	
2	0,34	260,20	98,22	98,72	0,32	257,54	98,15	98,17	0,34	255,58	97,64	97,85	
3	0,35	258,34	98,08	98,03	0,25	260,05	97,65	97,93	0,39	258,70	97,38	97,09	
4	0,20	257,72	98,30	98,33	0,26	256,88	98,08	98,37	0,21	255,66	97,25	97,55	
5	0,26	257,25	98,48	98,90	0,32	259,30	98,32	98,33	0,34	256,82	97,72	98,00	
6	0,32	255,37	98,09	98,73	0,22	256,10	98,04	97,92	0,20	257,27	97,06	97,55	
Метрологические измерения													
\bar{X}	0,29	257,91	98,26	98,51	0,27	258,21	98,08	98,12	0,29	257,08	97,45	97,66	
S^2_x	$3,67 \times 10^{-3}$	2,55	$2,71 \times 10^{-2}$	$1,09 \times 10^{-1}$	$1,78 \times 10^{-3}$	2,53	$5,37 \times 10^{-2}$	$3,95 \times 10^{-2}$	$6,08 \times 10^{-3}$	1,78	$6,84 \times 10^{-2}$	$1,12 \times 10^{-1}$	
CO	0,06	1,60	0,16	0,33	0,04	1,59	0,23	0,20	0,08	1,33	0,26	0,33	
RSD	21,26	0,62	0,17	0,33	15,71	0,62	0,24	0,20	26,89	0,52	0,27	0,34	

Продолжение Таблицы 4.10

№	Серия № 3031701 от 17.01.2020 г. при температуре 8 °С и относительной влажности 35±5 %			
	Месяц			
	24			
	Критерий исследования			
	ПМВ	НП	АА	ПА
1	0,39	258,70	96,90	96,60
2	0,31	260,62	96,93	96,70
3	0,20	255,54	97,30	96,90
4	0,38	259,43	96,96	97,22
5	0,22	258,03	97,02	97,21
6	0,28	255,71	97,03	96,78
Метрологические измерения				
\bar{X}	0,30	258,01	97,02	96,90
S^2_x	$6,27 \times 10^{-3}$	4,14	$2,09 \times 10^{-2}$	$6,86 \times 10^{-2}$
CO	0,08	2,03	0,14	0,26
RSD	26,68	0,79	0,15	0,27

Примечания: \bar{X} – средние значение критерия, S^2_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %, ПМВ – потеря массы при высушивании, НП – насыпная плотность, АА – амилолитическая активность, ПА – протеолитическая активность

Таблица 4.11 – Результаты исследования стабильности ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

СРОК , МЕС.	ОПИСАНИЕ	ПОДЛИН.	РАЗМЕР ЧАСТИЦ	ПОТЕРЯ МАССЫ ПРИ ВЫСУШ	НАСЫПНАЯ ПЛОТНОСТЬ	ОДНОРОДНОСТ Ь ДОЗИРОВАНИЯ	МБЧ	КОЛИЧ. ОПРЕД.	
		КАЧЕСТВ РЕАКЦИИ						АА	ПА
1	2	3	4	5	6	7	9	10	
	Порошок от белого до белого со слегка желтоватым оттенком цвета, со слабым характерным запахом	ЛС должна давать положительный результат на качественное определение хитозана и аскорбиновой кислоты	При ситовом анализе размер частиц должен быть не более 160 мкм	Определение показателя влажности, который должен составлять $0,30 \pm 0,1$	Определение показателя влажности, который должен составлять $257,0 \pm 1,5\%$	ЛС должно выдерживать требования ГФ РФ ОФС.1.4.2.0008.18 (результат удовлетворительный, если при $n=10$ первый показатель приемлемости $AV \leq L1$)	В соответствии с требованиями ГФ РФ	Активность ферментов должна составлять от 95,00-105,00 % от дозы в лекарственном средстве	
Серия № 3011501 от 15.01.2020 г. при температуре 21 °С и относительной влажности 45±5%									
0	Соответств	Соответств	Соответств	$0,23 \pm 0,04$	$258,09 \pm 0,46\%$	Соответств	Соответств	100,92	99,81
3	Соответств	Соответств	Соответств	$0,27 \pm 0,03$	$257,60 \pm 0,56\%$	Соответств	Соответств	99,45	99,25
6	Соответств	Соответств	Соответств	$0,27 \pm 0,07$	$258,46 \pm 0,73\%$	Соответств	Соответств	98,46	98,69
9	Соответств	Соответств	Соответств	$0,30 \pm 0,06$	$258,41 \pm 0,72\%$	Соответств	Соответств	98,16	98,20
12	Соответств	Соответств	Соответств	$0,31 \pm 0,06$	$258,04 \pm 0,65\%$	Соответств	Соответств	97,16	97,61
18	Соответств	Соответств	Соответств	$0,29 \pm 0,07$	$258,48 \pm 0,79$	Соответств	Соответств	96,11	96,23
24	Соответств	Соответств	Соответств	$0,31 \pm 0,05$	$256,78 \pm 0,61$	Соответств	Соответств	95,61	95,30

Продолжение Таблицы 4.11

СРОК, МЕС.	ОПИСАНИЕ	ПОДЛИН.	РАЗМЕР ЧАСТИЦ	ПОТЕРЯ МАССЫ ПРИ ВЫСУШ	НАСЫПНАЯ ПЛОТНОСТЬ	ОДНОРОДНОСТЬ ДОЗИРОВАНИЯ	МБЧ	КОЛИЧ. ОПРЕД.	
		КАЧЕСТВ. РЕАКЦИИ						АА	ПА
1	2	3	4	5	6	7	9	10	
	Порошок от белого до белого слегка желтоватым оттенком цвета, со слабым характерным запахом	ЛС должна давать положительный результат на качественное определение хитозана и аскорбиновой кислоты	При ситовом анализе размер частиц должен быть не более 160 мкм	Определение показателя влажности, который должен составлять $0,30 \pm 0,1$	Определение показателя влажности, который должен составлять $257,0 \pm 1,5\%$	ЛС должно выдерживать требования ГФ РФ ОФС.1.4.2.0008.18 (результат удовлетворительный, если при $n=10$ первый показатель приемлемости $AV \leq L1$)	В соответствии с требованиями ми ГФ РФ	Активность ферментов должна составлять от 95,00-105,00 % от дозы в лекарственном средстве	
Серия № 3011501 от 15.01.2020 г.									
при температуре 8 °С и относительной влажности 35±5%									
0	Соответств	Соответств	Соответств	$0,23 \pm 0,04$	$258,09 \pm 0,46\%$	Соответств	Соответств	100,92	99,81
3	Соответств	Соответств	Соответств	$0,29 \pm 0,07$	$257,90 \pm 0,89\%$	Соответств	Соответств	99,17	98,94
6	Соответств	Соответств	Соответств	$0,33 \pm 0,07$	$258,88 \pm 0,69\%$	Соответств	Соответств	98,76	98,75
9	Соответств	Соответств	Соответств	$0,28 \pm 0,04$	$257,98 \pm 0,52\%$	Соответств	Соответств	98,56	98,44
12	Соответств	Соответств	Соответств	$0,30 \pm 0,07$	$257,03 \pm 0,34\%$	Соответств	Соответств	98,16	98,02
18	Соответств	Соответств	Соответств	$0,32 \pm 0,07$	$257,62 \pm 0,70\%$	Соответств	Соответств	97,30	97,45
24	Соответств	Соответств	Соответств	$0,34 \pm 0,04$	$257,42 \pm 0,46\%$	Соответств	Соответств	97,04	97,04

Примечания: АА – амилалитическая активность, ПА – протеолитическая активность, МБЧ – микробиологическая чистота

Таблица 4.12 – Результаты исследования стабильности ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

СРОК , МЕС.	ОПИСАНИЕ	ПОДЛИН.	РАЗМЕР ЧАСТИЦ	ПОТЕРЯ МАССЫ ПРИ ВЫСУШ	НАСЫПНАЯ ПЛОТНОСТЬ	ОДНОРОДНОСТЬ ДОЗИРОВАНИЯ	МБЧ	КОЛИЧ. ОПРЕД.	
		КАЧЕСТВ РЕАКЦИИ						АА	ПА
1	2	3	4	5	6	7	9	10	
	Порошок от белого до белого слегка желтоватым оттенком цвета, со слабым характерным запахом	ЛС должна давать положительный результат на качественное определение хитозана и аскорбиновой кислоты	При ситовом анализе размер частиц должен быть не более 160 мкм	Определение показателя влажности, который должен составлять $0,30 \pm 0,1$	Определение показателя влажности, который должен составлять $257,0 \pm 1,5\%$	ЛС должно выдерживать требования ГФ РФ ОФС.1.4.2.0008.18 (результат удовлетворительный, если при $n = 10$ первый показатель приемлемости $AV \leq L1$)	В соответствии с требованиями ГФ РФ	Активность ферментов должна составлять от 95,00-105,00 % от дозы в лекарственном средстве	
Серия № 3021601 от 16.01.2020 г.									
при температуре 21 °С и относительной влажности 45±5%									
0	Соответств	Соответств	Соответств	$0,27 \pm 0,02$	$257,49 \pm 0,57\%$	Соответств	Соответств	100,70	99,70
3	Соответств	Соответств	Соответств	$0,30 \pm 0,02$	$258,00 \pm 0,57\%$	Соответств	Соответств	98,59	99,32
6	Соответств	Соответств	Соответств	$0,33 \pm 0,08$	$258,47 \pm 0,61\%$	Соответств	Соответств	98,63	98,69
9	Соответств	Соответств	Соответств	$0,31 \pm 0,06$	$258,16 \pm 0,80\%$	Соответств	Соответств	97,73	98,24
12	Соответств	Соответств	Соответств	$0,30 \pm 0,06$	$258,39 \pm 0,80\%$	Соответств	Соответств	97,07	97,45
18	Соответств	Соответств	Соответств	$0,28 \pm 0,07$	$257,75 \pm 0,50\%$	Соответств	Соответств	96,15	96,21
24	Соответств	Соответств	Соответств	$0,30 \pm 0,06$	$258,45 \pm 0,72\%$	Соответств	Соответств	95,77	95,01

Продолжение Таблицы 4.12

СРОК, МЕС.	ОПИСАНИЕ	ПОДЛИН.	РАЗМЕР ЧАСТИЦ	ПОТЕРЯ МАССЫ ПРИ ВЫСУШ	НАСЫПНАЯ ПЛОТНОСТЬ	ОДНОРОДНОСТЬ ДОЗИРОВАНИЯ	МБЧ	КОЛИЧ. ОПРЕД.	
		КАЧЕСТВ. РЕАКЦИИ						АА	ПА
1	2	3	4	5	6	7	9	10	
	Порошок от белого до белого слегка желтоватым оттенком цвета, слабым характерным запахом	ЛС должна давать положительный результат на качественное определение хитозана и аскорбиновой кислоты	При ситовом анализе размер частиц должен быть не более 160 мкм	Определение показателя влажности, который должен составлять $0,30 \pm 0,1$	Определение показателя влажности, который должен составлять $257,0 \pm 1,5\%$	ЛС должно выдерживать требования ГФ РФ ОФС.1.4.2.0008.18 (результат удовлетворительный, если при $n=10$ первый показатель приемлемости $AV \leq L1$)	В соответствии с требованиями ГФ РФ	Активность ферментов должна составлять от 95,00-105,00 % от дозы в лекарственном средстве	
Серия № 3021601 от 16.01.2020 г..									
при температуре 8 °С и относительной влажности 35±5%									
0	Соответств	Соответств	Соответств	$0,27 \pm 0,02$	$257,49 \pm 0,57\%$	Соответств	Соответств	100,70	99,70
3	Соответств	Соответств	Соответств	$0,29 \pm 0,08$	$258,04 \pm 0,60\%$	Соответств	Соответств	98,80	98,97
6	Соответств	Соответств	Соответств	$0,30 \pm 0,08$	$257,50 \pm 0,67\%$	Соответств	Соответств	98,80	98,64
9	Соответств	Соответств	Соответств	$0,30 \pm 0,08$	$257,76 \pm 0,73\%$	Соответств	Соответств	98,58	98,46
12	Соответств	Соответств	Соответств	$0,28 \pm 0,05$	$257,40 \pm 0,75\%$	Соответств	Соответств	98,10	98,04
18	Соответств	Соответств	Соответств	$0,31 \pm 0,07$	$257,20 \pm 0,46\%$	Соответств	Соответств	97,55	97,53
24	Соответств	Соответств	Соответств	$0,28 \pm 0,05$	$258,42 \pm 0,45\%$	Соответств	Соответств	97,22	96,87

Примечания: АА – амилолитическая активность, ПА – протеолитическая активность, МБЧ – микробиологическая чистота

Таблица 4.13 – Результаты исследования стабильности ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

СРОК , МЕС.	ОПИСАНИЕ	ПОДЛИННОСТЬ	РАЗМЕР ЧАСТИЦ	ПОТЕРЯ МАССЫ ПРИ ВЫСУШ	НАСЫПНАЯ ПЛОТНОСТЬ	ОДНОРОДНОСТЬ ДОЗИРОВАНИЯ	МБЧ	КОЛИЧ. ОПРЕД.	
		КАЧЕСТВ РЕАКЦИИ						АА	ПА
1	2	3	4	5	6	7	9	10	
	Порошок от белого до белого слегка желтоватым оттенком цвета, слабым характерным запахом	ЛС должна давать положительный результат на качественное определение хитозана и аскорбиновой кислоты	При ситовом анализе размер частиц должен быть не более 160 мкм	Определение показателя влажности, который должен составлять $0,30 \pm 0,1\%$	Определение показателя влажности, который должен составлять $257,0 \pm 1,5$	ЛС должно выдерживать требования ГФ РФ ОФС.1.4.2.0008.18 (результат удовлетворительный, если при $n = 10$ первый показатель приемлемости $AV \leq L1$)	В соответствии с требованиями ГФ РФ	Активность ферментов должна составлять от 95,00-105,00 % от дозы в лекарственном средстве	
Серия № 3031701 от 17.01.2020 г.									
при температуре 21 °С и относительной влажности 45±5%									
0	Соответств	Соответств	Соответств	$0,25 \pm 0,04$	$258,70 \pm 0,46\%$	Соответств	Соответств	100,7 5	99,68
3	Соответств	Соответств	Соответств	$0,27 \pm 0,04$	$258,13 \pm 0,72\%$	Соответств	Соответств	98,87	99,26
6	Соответств	Соответств	Соответств	$0,29 \pm 0,06$	$257,35 \pm 0,83\%$	Соответств	Соответств	98,56	98,77
9	Соответств	Соответств	Соответств	$0,28 \pm 0,05$	$257,71 \pm 0,79\%$	Соответств	Соответств	97,40	98,26
12	Соответств	Соответств	Соответств	$0,26 \pm 0,05$	$257,00 \pm 0,65\%$	Соответств	Соответств	96,94	97,63
18	Соответств	Соответств	Соответств	$0,28 \pm 0,07$	$259,14 \pm 0,67\%$	Соответств	Соответств	96,07	96,31
24	Соответств	Соответств	Соответств	$0,32 \pm 0,03$	$257,12 \pm 0,61\%$	Соответств	Соответств	95,56	95,14

Продолжение Таблицы 4.13

СРОК, МЕС.	ОПИСАНИЕ	ПОДЛИН.	РАЗМЕР ЧАСТИЦ	ПОТЕРЯ МАССЫ ПРИ ВЫСУШ	НАСЫПНАЯ ПЛОТНОСТЬ	ОДНОРОДНОСТЬ ДОЗИРОВАНИЯ	МБЧ	КОЛИЧ. ОПРЕД.	
		КАЧЕСТВ. РЕАКЦИИ						АА	ПА
1	2	3	4	5	6	7	9	10	
	Порошок от белого до белого слегка желтоватым оттенком цвета, слабым характерным запахом	ЛС должна давать положительный результат на качественное определение хитозана и аскорбиновой кислоты	При ситовом анализе размер частиц должен быть не более 160 мкм	Определение показателя влажности, который должен составлять $0,30 \pm 0,1$	Определение показателя влажности, который должен составлять $257,0 \pm 1,5\%$	ЛС должно выдерживать требования ГФ РФ ОФС.1.4.2.0008.18 (результат удовлетворительный, если при $n=10$ первый показатель приемлемости $AV \leq L1$)	В соответствии с требованиями ми ГФ РФ	Активность ферментов должна составлять от 95,00-105,00 % от дозы в лекарственном средстве	
Серия № 3031701 от 17.01.2020 г.									
при температуре 8 °С и относительной влажности 35±5%									
0	Соответств	Соответств	Соответств	$0,25 \pm 0,04$	$258,70 \pm 0,46\%$	Соответств	Соответств	100,75	99,68
3	Соответств	Соответств	Соответств	$0,27 \pm 0,04$	$258,02 \pm 0,61\%$	Соответств	Соответств	99,02	99,07
6	Соответств	Соответств	Соответств	$0,30 \pm 0,07$	$257,40 \pm 0,57\%$	Соответств	Соответств	98,63	98,76
9	Соответств	Соответств	Соответств	$0,29 \pm 0,06$	$257,91 \pm 0,62\%$	Соответств	Соответств	98,26	98,51
12	Соответств	Соответств	Соответств	$0,27 \pm 0,04$	$258,21 \pm 0,62\%$	Соответств	Соответств	98,02	98,12
18	Соответств	Соответств	Соответств	$0,29 \pm 0,08$	$257,08 \pm 0,52\%$	Соответств	Соответств	97,45	97,66
24	Соответств	Соответств	Соответств	$0,30 \pm 0,08$	$258,01 \pm 0,79\%$	Соответств	Соответств	97,03	96,90

Примечания: АА – амилалитическая активность, ПА – протеолитическая активность, МБЧ – микробиологическая чистота

На основании проведенных исследований стабильности ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» при температуре экспериментального хранения 8 °С и относительной влажности 35±5 % изготовленные серии № 3011501, 3021601, 3031701 не имели отклонений ни по одному критерию анализа.

На основании проведенных исследований стабильности ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения», при температуре экспериментального хранения 21 °С и относительной влажности 45±5 % изготовленные серии № 3011501, 3021601, 3031701 не имели отклонений ни по одному критерию анализа. Однако ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» имеет пограничные значения по показателям количественного определения, которые выражены в критериях амилолитической и протеолитической активности.

Таким образом на основании проведенных исследований стабильности ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения», проведенной согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» при помощи метода долгосрочного испытания стабильности можно установить, что срок годности ЛС составил 2 года (24 месяца).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

На основании многоуровневых исследований разработана технология получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения». Установлены и проанализированы критические контрольные точки производства, включающие анализ химических (Кх), технологических (Кт) и микробиологических (Км) показателей в процессе технологии получения.

Проведено исследование микробиологической чистоты ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения», которое показало, что ЛС необходимо изготавливать в асептических условиях.

Проведены исследования влияния условий и сроков хранения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» на их стабильность. Установлен срок годности при комнатной температуре хранения (до 25 °С) – не более 2 лет.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «ПОРОШОК БИОРАЗЛАГАЕМЫЙ ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ»

Для оценки показателей качества лекарственного средства применяются различные физические, химические и физико-химические методы, используют селективные и неселективные методы. Для оценки показателей качества ЛС «порошок биоразлагаемый» следует обратить внимание на регламентирующие источники по лекарственным средствам и формам [1, 3, 10, 23]. Документами, регламентирующими контроль качества данной ЛФ, являются ГФ РФ и Фармакопея ЕАЭС, которые дают сведения об общих тестах и критериях приемлемости, которые требуются при разработке НД на лекарственное средство.

5.1. Разработка и валидация аналитических методик определения показателей качества

Для анализа активных компонентов требуется разработка новых аналитических методик, в зависимости от состава лекарственного средства. Для разработки НД на лекарственное средство требуется точная количественная оценка активных компонентов, входящих в состав лекарственной формы. Для оценки точности применяется валидация аналитической методики согласно ГФ РФ и Решению Коллегии ЕЭК от 17 июля 2018 г. N 113 [10, 26]. Также кроме аналитической методики, требуется валидировать и метод пробоподготовки на модельных образцах, для получения максимально приближенных к истине данных анализа. Для стандартизации лекарственного средства обязательна оценка подлинности и некоторых входящих в ЛФ компонентов.

5.1.1. Методика оценки протеолитической активности лекарственного средства

Определение протеолитической активности проводилось согласно ГОСТ 20264.2-88 «Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности» [7]. Методика основана на определении свободных аминокислот, полученных путем расщепления пептидных связей в молекуле казеината натрия, спектрофотометрическим методом по значениям оптической плотности, после проведения реакции с реактивом Фолина.

Спектрофотометрическое определение проводится согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях» [10].

Подготовка к анализу протеолитической активности

Для проведения анализа требуется разведение растворов реагентов и манипуляций с ними необходимых для проведения анализа.

Приготовление раствора гидроксида натрия концентрации 0,1 моль/л. В мерную колбу на 1000 мл вносят 100 мл раствора гидроксида натрия концентрации 1 моль/л. Доводят объем раствора до метки дистиллированной водой.

Приготовление раствора казеината натрия (раствор субстрата). Субстрат казеина помещают в количестве 1,25 г в колбу объемом на 100 мл, содержащей 5 мл дистиллированной воды. Встряхивают для образования суспензии. Добавляют 10 мл раствора гидроксида натрия концентрацией 0,1 моль/л, перемешивают в течение 1 мин. Затем вносят 50 мл дистиллированной воды. Подвергают перемешиванию с помощью мешалки в течение 1 часа. Затем проводят измерение значения рН раствора – его значение должно составлять $6,2 \pm 0,2$. Полученный раствор переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят объем раствора дистиллированной водой до метки и перемешают [7, 88]. Субстрат казеина используют в день приготовления.

Приготовление раствора натрия двууглекислого (карбоната натрия) концентрации 2,5 моль/л. Точную навеску карбоната натрия в количестве 265,00 г переносят в колбу на 1000 мл. Доводят объем до метки горячей (60°C) дистиллированной водой до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление рабочего раствора реактива Фолина. Рабочий раствор реактива Фолина готовится путем разведения основного раствора 1:3 для определения протеолитической активности спектрофотометрическим методом [7].

Для вычисления протеолитической активности строят градуировочную характеристику по тирозину и по ней вычисляют тирозиновый эквивалент (ТЭ), то есть ту оптическую плотность, которую бы дал 1 мкмоль тирозина в 1 мл стандартного раствора. Этот эквивалент необходимо установить для каждой новой партии реактива Фолина и каждого фотоэлектрического колориметра [7].

Приготовление раствора ферментного препарата. Взвешивают и тонко измельчают не менее 10 грамм порошка, избегая нагревания. Точную навеску количеством, соответствующим массе 5 грамм образца, переносят в колбу на 10 мл и доводят объем до метки свежеприготовленным буферным раствором. Точная навеска аликвотной доли (г) для анализа составляет эквивалентное количество массы 1 грамма порошка.

Приготовление раствора трихлоруксусной кислоты. Точную навеску массой 50,00 г переносят в колбу на 1000 мл, доводят объем до метки дистиллированной водой [7].

Приготовление стандартного раствора тирозина. Для построения градуировочной характеристики готовят раствор тирозина концентрации 1 ммоль/л [7]. Для этого точную навеску массой 181,20 мг чистого тирозина растворяют в растворе соляной кислоты концентрации 0,2 моль/л в мерной колбе вместимостью 1000 мл.

Приготовление калибровочных растворов тирозина. Калибровочные растворы тирозина получают путем разведения стандартного раствора тирозина (растворы № 1-6). Для этого вносят в каждую виалу по X мл раствора тирозина разной концентрации и добавляют при постоянном перемешивании по Y мл раствора дистиллированной воды, 1 мл раствора карбоната натрия концентрации 2,5 моль/л и 1 мл рабочего раствора реактива Фолина. Дают реакционной смеси прореагировать в течение 20 мин [7]. Схема процесса приготовления калибровочных растворов представлена в Таблице 5.1.

Приготовление контрольного раствора для построения калибровочной кривой. Контрольный раствор для построения калибровочной кривой готовят также, но вместо раствора тирозина используют 1 мл дистиллированной воды [7]. Дают реакционной смеси прореагировать в течение 20 мин.

Таблица 5.1 – Общая схема приготовления калибровочных растворов

№ Раствора	Объем стандартного раствора тирозина, мл	Объем раствора карбоната натрия, мл	Объем дистиллированной воды, мл	Объем раствора реактива Фолина, мл	Полученная концентрация, ммоль/л
1	0,50	1,00	4,50	1,00	0,0714
2	1,00	1,00	4,00	1,00	0,1429
3	1,50	1,00	3,50	1,00	0,2143
4	2,00	1,00	3,00	1,00	0,2857
5	3,00	1,00	2,00	1,00	0,4286
6	5,00	1,00	-	1,00	0,7143

Построение калибровочной кривой. Интенсивность окраски измеряется спектрофотометрическим методом в сравнении контрольным раствором в диапазоне длин волн 630-760 нм. По средним данным, полученным из двух опытов, строится градуировочная характеристика, имеющая линейную зависимость [7].

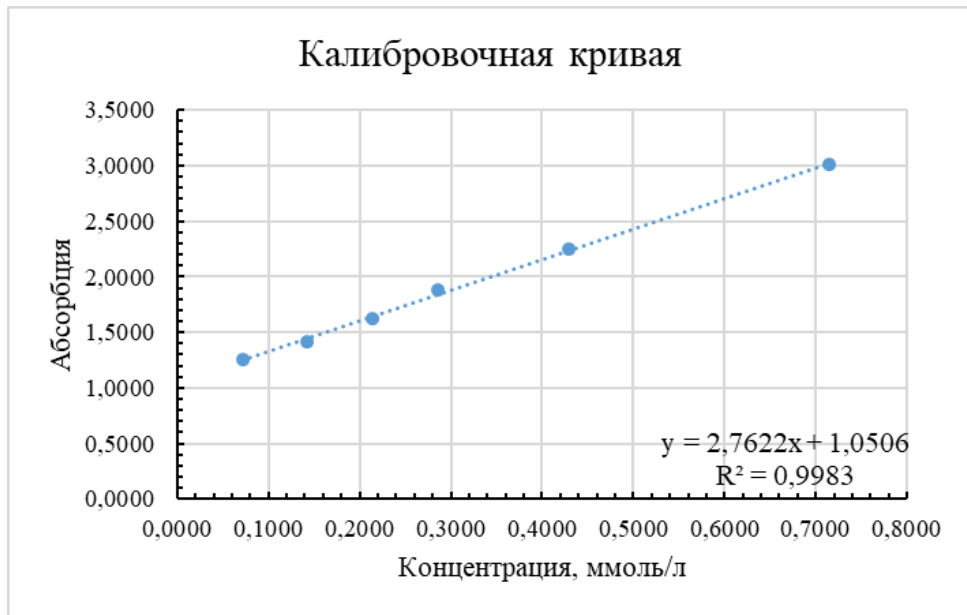


Рисунок 5.1 – Калибровочная кривая анализа протеолитической активности

Приготовление раствора исследуемого образца. В виалу на 15 мл вносят 2 мл раствора субстрата и помещают на водяную баню, разогретую до 30 °С, на 10 минут. Затем добавляют 2 мл раствора ферментного препарата, (предварительно термостатированного при 30 °С в течение 3-4 мин), виалу встряхивают и оставляют на гидролиз на 70 мин при температуре 30 °С. Через 70 мин добавляют по 4 мл раствора ТХУ, чтобы прервать ферментативную реакцию и осадить белок и высокомолекулярные продукты гидролиза. Быстро перемешивают смесь и для обеспечения полного осаждения выдерживают пробирки со смесью при температуре 30 °С еще в течение 20 мин. Затем смесь подвергается центрифугированию при 6000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант в объеме 5 мл отбирается для анализа в виалу с предварительно налитыми туда 1 мл раствора натрия карбоната концентрации 2,5 моль/л, перемешивают и быстро приливают по 1 мл рабочего раствора реактива Фолина. Дают реакционной смеси постоять в течение 20 мин. После реакции растворы приобретают голубую окраску, что свидетельствует о протекании реакции.

Приготовление раствора контрольного для проведения анализа. Контрольный опыт готовят, прибавляя реактивы в обратной последовательности: для этого в контрольную виалу наливают 2 мл раствора ферментного препарата, как и в опыте, добавляют 4 мл раствора ТХУ, выдерживают в на водяной бане при температуре 30 °С в течение 10 мин, а затем вносят 2 мл раствора субстрата. По истечении 20 мин нахождения на водяной бане раствор центрифугируют, 5 мл супернатанта отбирают в сухую виалу с предварительно налитыми туда 1 мл раствора натрия карбоната концентрации 2,5 моль/л, перемешивают и быстро приливают по 1 мл рабочего раствора реактива Фолина. Дают реакционной смеси постоять 20 мин.

Разработка методики оценки протеолитической активности

Определение значения экстремумов абсорбции по спектру стандарта тирозина. Для определения экстремумов абсорбции, по которым возможно проведение количественной оценки, был снят спектр абсорбции в калибровочном образце тирозина с концентрацией 0,1429 ммоль/л. Спектр абсорбции тирозина в УФ-диапазоне в заданной области (длины волн 300-1000 нм) представлен на Рисунке 5.2. Характеристически значимые длины волн для данного спектра имеют значения: 430 нм, 600 нм и 760 нм (точки экстремумов функции на графике). Также было определено количество образца необходимое для точного определения максимума спектра поглощения на спектрофотометре. Количество образца необходимое для точного определения максимума спектра составило 200 мкл.

Согласно полученным данным спектра абсорбции тирозина в УФ-диапазоне максимумы поглощения при длине волны имели значения при 760 нм, поэтому расчеты для образцов были выполнены в соответствии с данной длиной волны.

Данные показатели были достигнуты после введения параметра «время проведения реакции с реактивом Фолина», которая составила 20 мин. Если не придерживаться данного параметра, то экстремум функции имеет неточные значения, которые влияют на специфичность методики.

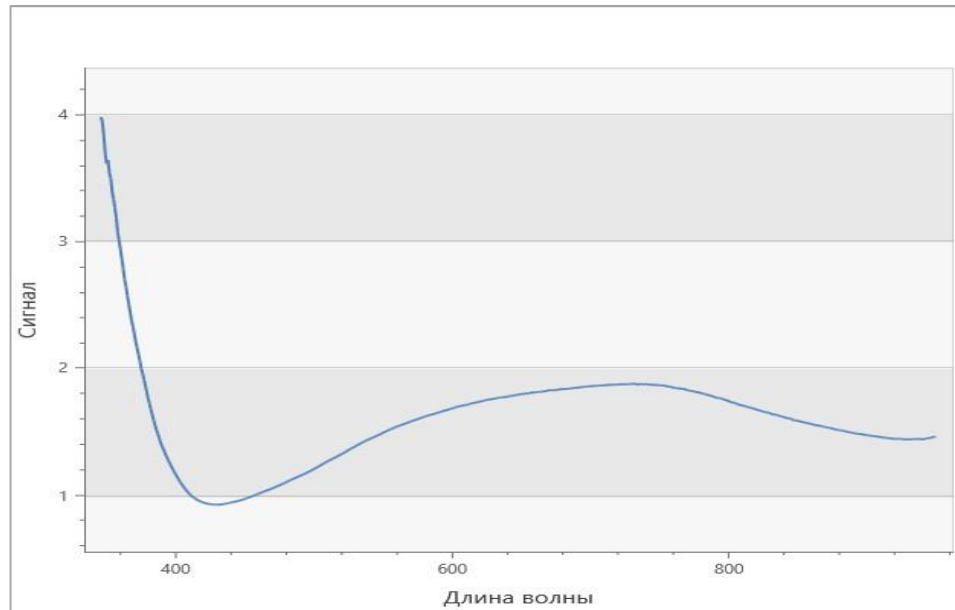


Рисунок 5.2 – Спектр абсорбции тирозина в УФ-диапазоне

Определение количества образца и времени протекания ферментативной реакции. Для повышения чувствительности и специфичности аналитической методики определения протеолитической активности по ГОСТ 20264.2-88 «Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности» при подготовке проб были изменены: время

ферментации (до 70 мин) и количество образца в каждой пробе в пересчете на 1 дозу лекарственного средства. Формула расчета получения значения протеолитической активности [7] в Международных единицах действия (МЕ) имела вид:

$$ME = \frac{\Delta D \times 4}{TЭ \times 70 \times m} \times 1000,$$

где ΔD – разница между значениями абсорбции контрольного и анализируемого образцов; 70 – время гидролиза субстрата, мин; m – масса ферментного препарата, взятая на протеолиз, мг; 4 – отношение объемов реакционной смеси и раствора фермента после добавления ТХУ; ТЭ – тирозиновый эквивалент, определяемый по градуировочной характеристике, моль/л; m – масса ферментного препарата, взятая на протеолиз (расчет ведется на 1 мл ферментного раствора), мг; 1000 - переводной коэффициент полученных единиц на 1 г ферментного препарата.

Для проведения исследования по определению абсорбции аликвотный объем всех растворов в количестве 200 мкл переносили с помощью механического дозатора в 96 лунный планшет.

Построение калибровочной кривой. Перед проведением исследования была приготовлена серия калибровочных растворов тирозина для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая по средним значениям концентраций калибровочных растворов представлена на Рисунке 5.1. Для расчета протеолитической активности ЛС, выраженной в МЕ, был найден ТЭ по данным калибровочного графика. Согласно полученной калибровочной кривой, ТЭ имеет значение 4,2115 ммоль/л.

Валидация аналитической методики оценки протеолитической активности

Валидация аналитической методики оценки протеолитической активности выполнялось согласно Решению Коллегии ЕЭК от 17 июля 2018 г. № 113 по характеристикам, которые требуются для количественных испытаний на активность. Были исследованы характеристики: специфичность, правильность, повторяемость, промежуточная прецизионность, линейность, диапазон применения [26].

Специфичность аналитической методики. Характеристика специфичность оценивает возможность методики точно определить компонент или компоненты лекарственного средства и различить их от примесей, которые будут определяться в смеси вспомогательных веществ [10].

В нашем случае характеристику специфичность определяют соответствием длинны волны серосодержащих аминокислот у различных модельных образцов и калибровочного раствора стандартного образца (СО) тирозина, которые образуются в результате реакции субстрата и протеолитического фермента. Также был анализирован образец плацебо, представляющий из себя раствор субстрата казиената натрия. Результаты испытаний валидационной характеристики специфичность представлены в Таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Результаты исследования характеристики специфичности методики

Образец	Экстремум абсорбции, нм	$X_{cp} \pm S_x$
Модельный образец исследуемого раствора ЛФ	761	760±1
	759	
	760	
Калибровочный образец раствора СО №2	760	760±1
	759	
	761	
Калибровочный образец раствора СО №5	760	760,33±0,58
	760	
	761	
Модельный образец «Плацебо»	–	–

Как показывают результаты исследования характеристики специфичности методики, представленные в Таблице 5.2., наблюдается совпадение экстремума абсорбции при длине заданной волны. Также было обнаружено, что субстрат не оказывает влияния на качество полученных результатов, так как не содержит гидролизованных остатков серосодержащих аминокислот.

Совпадение полученных экстремумов функции 3 образцов с различной концентрацией компонентов дает возможность сделать вывод: аналитическая методика оценки протеолитической активности позволяет получить специфичный результат определения и соответствует анализируемой валидационной характеристике.

Диапазон измерений аналитической методики. Под характеристикой диапазона измерений аналитической методики понимают интервал между верхним и нижним значениями концентраций, в котором возможно точное количественное определение образца. Диапазон измерения методики зависит от предъявляемых требований к методике или от того, насколько экспериментальные точки могут удовлетворять валидационной характеристике линейности [10, 26].

В нашем случае методика предназначена для количественного определения протеолитической активности лекарственного средства и диапазон требуется установить в интервале от 80 до 120 % от предполагаемого значения определяемой аналитической характеристики. Для проведения теста растворения лекарственного средства, в данном случае диапазон аналитической методики составляет от 50 до 120 %.

Экспериментально-расчетным методом было установлено, что при значении протеолитической активности в 20 МЕ, значение концентрации модельного раствора составляет 0,3500 ммоль/л. Для вычисления нижнего предела количественного определения методики было использован диапазон от 50 до 120 %, где 50 % от этой концентрации, имело значение 0,1750 ммоль/л. Для удобства разведения, значение этой точки было снижено и составило 0,1429

ммоль/л. Диапазон определения методики был снижен до 0,0714 ммоль/л, так как высвобождение лекарственного средства на момент разработки методики не было установлено.

Повторяемость аналитической методики. Характеристика повторяемость оценивает возможность методики получать сходимые результаты определения между сериями исследования, которые должны входить в ошибку определения по спецификации аналитического оборудования. Результаты определения должны быть получены в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории и должны быть получены в короткий промежуток времени одним химиком-аналитиком.

Валидационная характеристика повторяемость исследовалась на трех калибровочных растворах, расположенных в различных частях диапазона измерений аналитической методики в 5 повторностях. Таким образом были выбраны калибровочные растворы различных концентраций с порядковыми номерами 1, 3, 6. Также для исследования повторяемости результатов пробоподготовки был проверен анализ модельного раствора лекарственного средства в 5 повторностях. Результаты исследования валидационной характеристики повторяемость представлены в Таблице 5.3.

Согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 5725-2002 нужно рассчитать «предел прецизионности» [5]. Это позволяет решить, существует ли значительная разница между результатами анализа проб, проведенных при определенных условиях, при определенном уровне достоверности. Предел достоверности Δz рассчитывают по уравнению:

$$\Delta z = \sqrt{2 \times t \times S_r},$$

где множитель $\sqrt{2}$ отражает разницу между 2 измерениями, t – двусторонний критерий Стьюдента.

Максимально допустимая неопределенность результата Δ_{AS} была рассчитана на основании спецификации химопсина. Активность протеолитического фермента составляет 15-25 МЕ. Согласно пересчету в проценты, эта величина принимает вид 75-125 %. Для калибровочных растворов точность разведения должна быть 99-101 %. Результаты представлены в Таблице 5.4.

Таблица 5.3 – Оценка валидационной характеристики повторяемость

	Концентрация стандартного раствора, ммоль/л			Концентрация модельного раствора, ммоль/л
	0,0714	0,2143	0,7143	0,3500
	№ калибровочного раствора			Количество фермента, МЕ
	1	3	6	20
Проба №	Абсорбция			
1	1,2580	1,6234	3,0074	1,4733
2	1,2556	1,6211	2,9955	1,4769
3	1,2592	1,6245	3,0263	1,4756
4	1,2571	1,6253	2,9985	1,4745
5	1,2605	1,6202	3,0140	1,4778
Метрологические измерения				
Среднее значение	1,2581	1,6229	3,0083	1,4756
Стандартное отклонение	0,00183	0,00174	0,01553	0,001805
RSD, %	0,149911	0,10690	0,51629	0,122302

Таблица 5.4 – Результаты вычислений всех метрологических параметров для оценки характеристики повторяемость для калибровочных и модельных растворов

P-p	A _i	\bar{A}	S ² _x	$\sum d_i^2$	S _x	S _r	RSD, %	Δz
КО1	1,2580	1,2581	3,56×10 ⁻⁶	0,00142	0,00189	0,00150	0,14991	0,001979
	1,2556							
	1,2592							
	1,2571							
	1,2605							
КО3	1,6234	1,6229	4,78×10 ⁻⁶	0,00180	0,00219	0,001346	0,13465	0,002293
	1,6211							
	1,6245							
	1,6253							
	1,6202							
КО6	3,0074	3,0083	0,00024	0,01096	0,01550	0,00515	0,51474	0,01627
	2,9955							
	3,0263							
	2,9985							
	3,0140							
МО	1,4733	1,4756	3,25×10 ⁻⁶	0,001384	0,00180	0,00122	0,12230	0,00189
	1,4769							
	1,4756							
	1,4745							
	1,4778							

Примечания: A_i – значение абсорбции i компонента; \bar{A} – среднее значение; $\sum d_i^2$ – среднее квадратичное отклонение, S²_x – дисперсия; S_x – стандартное отклонение; S_r – Относительное стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; Δz – Односторонний доверительный интервал. КО – калибровочный раствор; МО – модельный образец.

Максимально допустимая неопределенность результата $\Delta_{AS} = 8 \%$ для модельного раствора и $\Delta_{AS} = 0,32 \%$ для калибровочных растворов. Двусторонний доверительный интервал Δz не превышает 0,32%, следовательно, выборку можно считать однородной.

Промежуточная прецизионность аналитической методики. Характеристика повторяемость оценивает возможность методики получать сходимые результаты определения между сериями исследования, которые должны входить в ошибку определения по спецификации аналитического оборудования [26]. Результаты определения должны быть получены в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории, в короткий промежуток времени разными химиками-аналитиками, имеющими доступ к данному оборудованию.

Валидационная характеристика повторяемость исследовалась на трех калибровочных растворах, расположенных в различных частях диапазона измерений аналитической методики 3 химиками-аналитиками. Таким образом были выбраны калибровочные растворы различных концентраций с порядковыми номерами 1, 3, 6. Также для исследования повторяемости результатов пробоподготовки был проверен анализ модельного раствора лекарственного средства 3 химиками-аналитиками. Результаты исследования валидационной характеристики повторяемость представлены в Таблицах 5.5. и 5.6.

Таблица 5.5 – Оценка характеристики промежуточной прецизионности для химика- аналитика 1

	Концентрация стандартного раствора, ммоль/л			Концентрация модельного раствора, ммоль/л
	0,2143	0,7143	0,2143	0,3500
	Номер калибровочного раствора			Количество фермента, МЕ
	1	3	6	20
	Абсорбция			
Химик- аналитик 1	1,2580	1,6234	3,0074	1,4733
	1,2556	1,6211	2,9955	1,4769
	1,2592	1,6245	3,0263	1,4756
	1,2571	1,6253	2,9985	1,4745
	1,2605	1,6202	3,0140	1,4778
	Метрологические измерения			
Среднее значение	1,2581	1,6229	3,0083	1,4756
Стандартное отклонение	0,00183	0,00174	0,01553	0,001805
RSD, %	0,149911	0,10690	0,51629	0,122302

Таблица 5.6 – Оценка характеристики промежуточной прецизионности для химика-аналитика 2

	Концентрация стандартного раствора, ммоль/л			Концентрация модельного раствора, ммоль/л
	0,2143	0,7143	0,2143	0,3500
	Номер калибровочного раствора			Количество фермента, МЕ
	3	6	3	20
Абсорбция				
Химик-аналитик 2	1,2575	1,6244	3,0081	1,4743
	1,2549	1,6219	2,9961	1,4779
	1,2604	1,6255	3,0253	1,4757
	1,2565	1,6249	2,9997	1,4749
	1,2583	1,6203	3,0080	1,4762
Метрологические измерения				
Среднее значение	1,2575	1,6234	3,0074	1,4758
Стандартное отклонение	0,00205	0,00221	0,01127	0,00138
RSD, %	0,16301	0,13608	0,37480	0,09364

Относительное стандартное отклонение результатов испытаний, полученных двумя химиками-аналитиками, имеют значение менее 2,7 %. Для сравнения дисперсий вариационных рядов, полученных для результатов каждого химика-аналитика, использовали критерий Фишера (F) [48, 134]. Результаты вычислений оформлены в Таблице 5.7.

Таблица 5.7 – Результаты вычислений критерия Фишера

P-p	Химик-аналитик 1 (S^2_1)	Химик-аналитик 2 (S^2_2)	F_1
КО1	$3,56 \times 10^{-6}$	$4,20 \times 10^{-6}$	0,8756
КО3	$4,77 \times 10^{-6}$	$4,88 \times 10^{-6}$	0,9837
КО6	$2,41 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-4}$	0,8553
МО	$3,26 \times 10^{-6}$	$2,49 \times 10^{-6}$	0,6178

Примечания: S^2_x – дисперсия; F – критерий Фишера; КО – калибровочный раствор; МО – модельный образец.

Критическое значение Фишера определено по Таблице, учитывая доверительный интервал (P) и число степеней свободы (n-1). Табличное значение критерия Фишера $F_{(0,95;5;5)} = 5,05$. Затем, используя критерий Фишера, сравнивали дисперсии, вычисленные для результатов каждого химика-аналитика, с Табличным значением. Все полученные значения были меньше критического значения критерия Фишера, определенного по Таблице. Следовательно, дисперсии различаются незначительно. Можно сравнивать средние значения внутри одной концентрации, рассматривая значения каждой группы как отдельную выборку.

Затем была проведена оценка выборки средних значений на однородность [47] для результатов испытаний, полученных каждым химиком-аналитиком [48]. В результате математической обработки данных получили результаты вычислений, которые внесены в Таблицу 5.8.

Таблица 5.8 – Результаты вычислений дисперсии и критерии Стьюдента

Образец	Химик-аналитик	S_x^2	n_1	n_2	t
КО1	ХА1	$3,56 \times 10^{-6}$	5	5	0,3576
	ХА2	$4,20 \times 10^{-6}$			
КО3	ХА1	$4,77 \times 10^{-6}$			0,1479
	ХА2	$4,88 \times 10^{-6}$			
КО6	ХА1	$2,41 \times 10^{-4}$			0,5350
	ХА2	$1,54 \times 10^{-4}$			
МО	ХА1	$3,26 \times 10^{-6}$	0,7256		
	ХА2	$2,49 \times 10^{-6}$			

Примечания: S_x^2 – дисперсия; F – критерий Фишера; КО – калибровочный раствор; МО – модельный образец, ХА – химик-аналитик.

Сравнили вычисленные значения критерия Стьюдента с Табличным $t_{0,95;10} = 2,23$. Все вычисленные значения не превышают Табличного значения. Следовательно, между средним арифметическим значением результатов испытаний 2-х химиков-аналитиков нет значимых различий.

Линейность аналитической методики. Для доказательства линейности аналитической методики были проанализированы калибровочные растворы тирозина, концентрации которых представлены в Таблице 5.9. Линейная зависимость была исследована в пределах выбранного аналитического диапазона валидируемой методики. По полученным данным построен график и программно оценена линейность аналитической методики, результат обработан при помощи регрессионного анализа методом наименьших квадратов. Для оценки линейности рассчитан коэффициент корреляции, который равен 0,9983. Также для оценки характеристики линейности были получены параметры согласно уравнению функции прямой $y=k \times x+a$. Определены точка пересечения с осью ординат а, который равен 1,0506, и тангенс угла наклона прямой k, который равен 2,7622.

Коэффициент корреляции отражает линейную зависимость полученной абсорбции от количественного определения протеолитической активности в модельном растворе. Коэффициент корреляции составляет 0,9983, что соответствует требованиям ГФ РФ.

Таблица 5.9 – Результаты вычислений параметров для оценки линейности

№	Содержание определяемого вещества, ммоль/л	Абсорбция	Среднее значение абсорбции	Метрологические измерения	
				$\sum d_i^2$	
1	0,0714	1,2580	1,2581	$\sum d_i^2$	0,00142
		1,2556		S_x^2	$3,56 \times 10^{-6}$
		1,2592		S_x	0,00189
		1,2571		S_r	0,00150
		1,2605		RSD	0,14991
2	0,1429	1,4131	1,4128	$\sum d_i^2$	0,00087
		1,4142		S_x^2	$1,21 \times 10^{-6}$
		1,4114		S_x	0,00110
		1,4121		S_r	0,00078
		1,4134		RSD	0,07795
3	0,2143	1,6234	1,6229	$\sum d_i^2$	0,00180
		1,6211		S_x^2	$4,78 \times 10^{-5}$
		1,6245		S_x	0,00219
		1,6253		S_r	0,001346
		1,6202		RSD	0,13465
4	0,2857	1,8783	1,8778	$\sum d_i^2$	0,00117
		1,8769		S_x^2	$2,04 \times 10^{-6}$
		1,8757		S_x	0,00143
		1,8791		S_r	0,00076
		1,8788		RSD	0,07603
5	0,4286	2,2528	2,2534	$\sum d_i^2$	0,00111
		2,2513		S_x^2	$2,49 \times 10^{-6}$
		2,2556		S_x	0,00158
		2,2540		S_r	0,00070
		2,2535		RSD	0,07007
6	0,7143	3,0074	3,0094	$\sum d_i^2$	0,00945
		2,9955		S_x^2	$2,41 \times 10^{-4}$
		3,0263		S_x	0,01553
		2,9985		S_r	0,00516
		3,0140		RSD	0,516298

Правильность аналитической методики. Характеристика правильность оценивает отклонение от среднего результата определений, выполненных с использованием валидированной аналитической методики, от значений принятых за истинное.

В нашем случае характеристику правильность определяли по сериям образцов, состоящим из модельных образцов и калибровочного раствора стандартного образца (СО) тирозина № 1, 3 и 5. Также проводилась оценка правильности количественного определения модельного раствора, содержащего протеолитический фермент в количестве 20 МЕ. Все образцы анализировались по 3 раза. Результаты испытаний валидационной характеристики правильность представлены в Таблице 5.10 и 5.11.

Для оценки правильности определяется степень соответствия между известным истинным значением и значением, полученным по данной методике. Правильность методики будет

определяться величиной отношения «найденного» к «введенному» Z (%) с доверительным интервалом. Методика не должна иметь значимой систематической погрешности (δ %), то есть, величина δ % = $|Z - 100|$ должна незначимо отличаться от нуля. Результаты проведения статистической обработки представлены в Таблице 5.12. Правильность оценивали по двум критериям, которые описаны в работах [48, 83, 134].

Таблица 5.10 – Оценка характеристики правильности для калибровочных растворов

	Концентрация стандартного раствора, ммоль/л											
	0,0714				0,2143				0,7143			
	Номер калибровочного раствора											
	1				3				6			
	ИК	PK*	ε	КО	ИК	PK*	ε	КО	ИК	PK*	ε	КО
1	0,0713	0,0714	99,80	1,2556	0,2141	0,2143	99,89	1,6211	0,7186	0,7143	100,60	3,0263
2	0,0715	0,0714	100,19	1,2605	0,2146	0,2143	100,2	1,6253	0,7157	0,7143	100,19	3,0140
3	0,0715	0,0714	100,09	1,2592	0,2139	0,2143	99,83	1,6202	0,7113	0,7143	99,57	2,9955
\bar{A}	100,03			1,2584	99,2			1,6222	99,8			3,0119
CO	0,00253				0,00272				0,01550			
RSD	0,20171				0,16780				0,51474			

Примечания: *PK – рассчитанная концентрация в ммоль/л, RSD – относительное стандартное отклонение, CO – стандартное отклонение, КО – Абсорбция, ИК – известная концентрация в ммоль/л, ε – точность в %, \bar{A} – среднее значение.

Таблица 5.11 – Оценка характеристики правильности для модельных растворов

	Концентрация модельного раствора, ммоль/л					
	0,3500					
	Количество фермента, МЕ					
	20					
	ИК	PK*	МЕ	ε , %	КО	
1	0,3498	0,3500	19,99	99,95	1,4733	
2	0,3509	0,3500	20,05	100,26	1,4778	
3	0,3501	0,3500	20,01	100,03	1,4745	
\bar{A}	100,08				1,4752	
CO	0,00233					
RSD %	0,157961					

Примечания: *PK – рассчитанная концентрация в ммоль/л, RSD – относительное стандартное отклонение, CO – стандартное отклонение, КО – Абсорбция, ИК – известная концентрация в ммоль/л, ε – точность в %, \bar{A} – среднее значение.

Максимально допустимая неопределенность результата Δ_{AS} была рассчитана на основании требований ГФ РФ. Верхний предел методики определения ФС (V_H) должен иметь значение 101 %, а нижний предел (V_L) – 99 %. Поэтому величина Δ_{AS} имеет значение 0,32. Статистическая незначимость δ % = 0,1024. Сравнили значения максимально допустимой неопределенности анализа и фактически вычисленное в ходе испытаний каждой группы образцов различных концентраций концентраций: $0,1024 \geq \frac{\Delta z}{\sqrt{n}}$.

Таблица 5.12 – Результаты вычислений всех метрологических параметров для оценки характеристики повторяемости для калибровочных и модельных растворов

P-p	A_i	\bar{A}	S_x^2	$\sum d_i^2$	S_x	S_R	RSD, %	Δz
КО1	1,2556	1,2584	$6,44 \times 10^{-6}$	0,00189	0,00254	0,00202	0,20171	0,00266
	1,2605							
	1,2592							
КО3	1,6211	1,6222	$7,41 \times 10^{-6}$	0,00207	0,00272	0,00168	0,16780	0,00286
	1,6253							
	1,6202							
КО6	3,0263	3,0119	0,00024	0,01096	0,01550	0,00515	0,51474	0,01627
	3,0140							
	2,9955							
МО	1,4733	1,4752	$5,43 \times 10^{-6}$	0,00173	0,00233	0,00158	0,15796	0,00244
	1,4778							
	1,4745							

Примечания: A_i – значение абсорбции i компонента; \bar{A} – среднее значение; $\sum d_i^2$ – среднее квадратичное отклонение, S_x^2 – дисперсия; S_x – стандартное отклонение; S_R – Относительное стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; Δz – Односторонний доверительный интервал. КО – калибровочный раствор; МО – модельный образец.

Отклонение среднего значения для степени извлечения Z_{cp} от 100 % не превышает требования критерия статистической незначимости, и систематическая погрешность не является статистически отличимой от нуля [48].

Согласно работе [48] в нашем валидационном исследовании выполняется требование к критерию статистической незначимости, поэтому дальнейшее использование критерия практической незначимости по сравнению с максимально допустимой неопределенностью анализа не применяли.

На основании экспериментальных данных, полученных в процессе валидации аналитической методики по показателю протеолитической активности в ЛФ методом спектрометрии в ультрафиолетовой области, доказано, что результаты испытаний соответствуют требованиям критериев приемлемости по всем изученным показателям, что подтверждает соответствие данной методики установленным критериям и позволяет контрольно-аналитической лаборатории корректно воспроизводить данную методику и получать достоверные результаты.

5.1.2. Методика оценки амилолитической активности лекарственного средства

Определение амилолитической активности лекарственного средства проводилось согласно ГОСТ 54330-2011 «Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилолитической активности» [4]. Методика основана на количественном определении прогидролизованного крахмала в результате гидролиза ферментами

амилолитического ряда до декстринов различной молекулярной массы в стандартных условиях со спектрофотометрической регистрацией по значениям оптической плотности. Спектрофотометрическое определение проводится согласно ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях» [10, 89].

За единицу амилолитической активности принимается такое количество фермента, которое при значениях pH $7,2 \pm 0,1$ и температуре 30 ± 1 °C за один час катализирует расщепление одного грамма крахмала до декстринов, что составляет 30 % крахмала, введенного в реакцию [4]. Активность выражается в единицах МЕ в пересчете на 1 дозу испытуемого лекарственного средства [4].

Подготовка к анализу амилолитической активности

Для проведения анализа требуется разведение растворов реагентов и манипуляций с ними необходимых для проведения анализа.

Приготовление стандартного раствора йода. В мерную колбу на 200 мл вносили 0,50 г йода кристаллического и 5,00 г калия йодида. Добавляли 50 мл дистиллированной воды и проводили растворение путем перемешивания. Полученный раствор доводят до метки дистиллированной водой [4].

Приготовление рабочего раствора йода. В мерную колбу на 1000 мл вносили 20 мл стандартного раствора йода. Объем раствора доводился дистиллированной водой до метки. Перед анализом у рабочего раствора йода фиксировали значение оптической плотности при диапазоне длин волн 440 нм. Значение оптической плотности рабочего раствора йода в сравнении с раствором дистиллированной воды должно составлять $0,22 \pm 0,01$ [4]. В случае отклонения этого значения добавляли дистиллированную воду или стандартный раствор йода до достижения необходимого значения оптической плотности.

Приготовление раствора ферментного препарата. Взвешивали и тонко измельчили не менее 10 таблеток. Точная навеска аликвотной доли (г) для анализа составляет эквивалентное количество массы 1 таблетки. Точную навеску количеством, соответствующим массе 5 таблеток образца, переносили в колбу на 10 мл и доводили объем до метки дистиллированной водой. Перед использованием в анализе раствор подогревают до 30 ± 1 °C. После приготовления раствора ферментного препарата была вычислена плотность.

Приготовление раствора субстрата. 1 г крахмала в пересчете на абсолютное сухое вещество с учетом влаги помещали в мерную колбу объемом 100 мл, вносили 25 мл дистиллированной воды, перемешивали. Затем вносили еще 25 мл дистиллированной воды и переносили колбу на кипящую водяную баню не менее чем на 15 минут до растворения крахмала. После растворения крахмала колбу охлаждали до комнатной температуры, добавляли 10 мл

раствора фосфатного буфера со значением рН $6,0 \pm 0,1$ [4]. Объем жидкости доводили до метки дистиллированной водой. Раствор крахмала готовили в день проведения анализа.

Приготовление калибровочных растворов. Калибровочные растворы готовили разведения субстрата (раствора крахмала) с добавлением 2 мл рабочего раствора йода.

Приготовление раствора исследуемого образца. В химический стакан вносили 100 мл раствора субстрата и нагревали на водяной бане при температуре 30 ± 1 °С в течение 5 минут. Затем в химический стакан с раствором субстрата вносили 2 мл раствора ферментного препарата и тщательно перемешивали. Реакционную смесь инкубировали при температуре 30 ± 1 °С в течение 3 минут.

Приготовление раствора контрольного образца. В химический стакан вносили 100 мл раствора субстрата и нагревали на водяной бане при температуре 30 ± 1 °С в течение 5 минут. Затем в химический стакан с раствором субстрата вносили 2 мл раствора дистиллированной воды и тщательно перемешивали. Реакционную смесь инкубировали при температуре 30 ± 1 °С в течение 3 минут.

Разработка методики оценки амилалитической активности

Определение значения экстремумов абсорбции по спектру стандарта йодокрахмального комплекса. Перед проведением анализа у рабочего раствора йода фиксировали значение оптической плотности при диапазоне длин волн 440 нм. Значение оптической плотности рабочего раствора йода в сравнении с раствором дистиллированной воды составило 0,044 нм, что соответствует критерию приемлемости методики в определении абсорбции рабочего раствора йода [4], так как объем аликвотного образца составлял 200 мкл.

Перед проведением исследования был снят спектр поглощения раствора, полученного после реакции рабочего раствора йода и субстрата (1 % свежеприготовленного раствора крахмала). Спектр абсорбции комплекса крахмал-йод в УФ-диапазоне представлен на Рисунке 5.3.

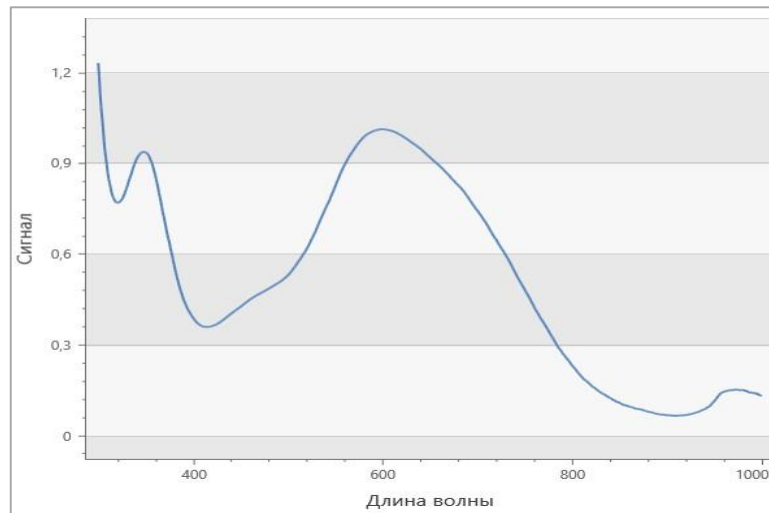


Рисунок 5.3 – Спектр ультрафиолетовой области комплекса крахмал-йод

Согласно полученным данным спектра, максимальная абсорбция, характерная для данного окрашенного раствора крахмала, составляет 594 нм (экстремум функции). По этому значению длины волны был проведен количественный анализ лекарственного средства.

Построение калибровочной кривой. Перед проведением исследования была приготовлена серия калибровочных растворов комплекса крахмал-йод для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая по средним значениям концентраций калибровочных растворов представлена на Рисунке 5.4.

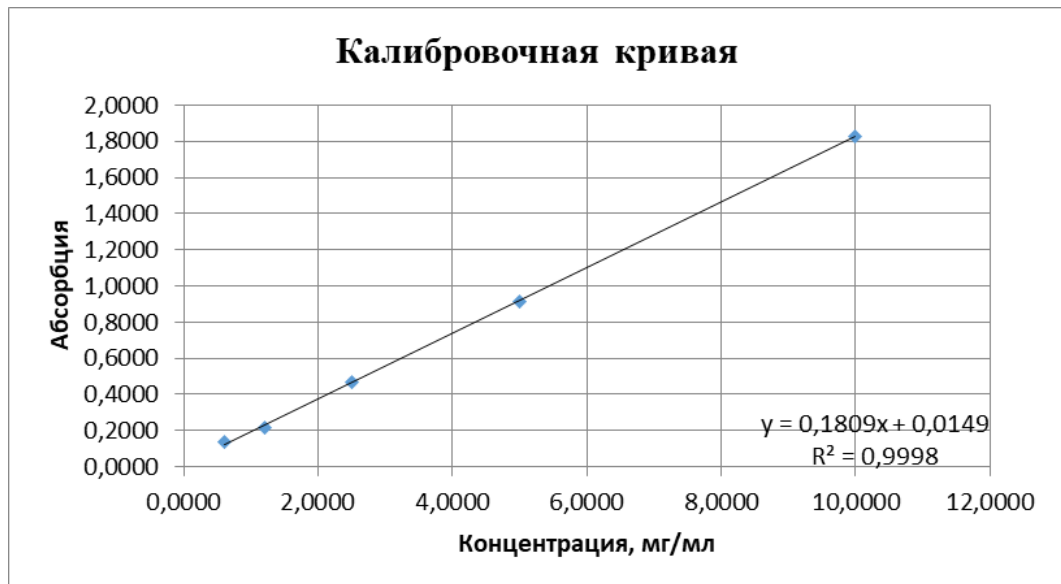


Рисунок 5.4 – Калибровочная кривая по комплексу иод-крахмал

Определение количества образца и времени протекания ферментативной реакции, построение калибровочной кривой: в ходе исследования было установлено, что 10 мл субстрата (1 % крахмала) в течение 30 минут полностью подвергаются ферментативному гидролизу. Для определения оптической плотности объем субстрата был увеличен в 10 раз, а время протекания

ферментативного гидролиза не было изменено, что позволило провести исследование и установить значение абсорбции при характеристической длине волны в 200 мкл анализируемого образца. Данные модификации методики были учтены в виде коэффициентов в расчетной формуле по определению амилолитической активности ЛП.

Концентрацию крахмала и активность фермента вычисляли по формулам указанным в соответствующем ГОСТ [4]. После добавления рабочего раствора йода растворы исследуемого и контрольного образцов приобретали сине-фиолетовую окраску различной интенсивности в зависимости от количества неферментированного крахмала.

Валидация аналитической методики оценки амилолитической активности. Валидация аналитической методики оценки протеолитической активности выполнялось согласно Решению Коллегии ЕЭК от 17 июля 2018 г. №113 по характеристикам, которые требуются для количественных испытаний на активность. Были исследованы характеристики: специфичность, правильность, повторяемость, промежуточная прецизионность, линейность, диапазон применения [26].

Специфичность аналитической методики. При валидационной оценке характеристики специфичность определяют соответствием длинны волны серосодержащих аминокислот у различных модельных образцов и калибровочного раствора стандартного образца (СО) йодокрахмального комплекса, которые образуются в результате реакции йода и крахмала. Также был анализирован образец плацебо, представляющий из себя рабочий раствор йода. Результаты испытаний валидационной характеристики специфичность представлены в Таблице 5.13.

Таблица 5.13 – Результаты исследования характеристики специфичности методики

Образец	Экстремум абсорбции, нм	$X_{cp} \pm S_x$
Модельный образец исследуемого раствора ЛФ	595	594±0,57
	594	
	594	
Калибровочный образец раствора СО №2	593	593±0,57
	594	
	594	
Калибровочный образец раствора СО №5	594	594±0,58
	594	
	595	
Модельный образец «Плацебо»	440	440±0,58
	441	
	440	

Как показывают результаты исследования характеристики специфичности методики, представленные в Таблице 5.14, наблюдается совпадение экстремума абсорбции при длине заданной волны. Также было обнаружено, что раствор йода имеет поглощение при 440 нм, что говорит о пригодности раствора для анализа. Совпадение полученных экстремумов функции

трех образцов с различной концентрацией компонентов дает возможность сделать вывод: аналитическая методика оценки протеолитической активности позволяет получить специфичный результат определения и соответствует анализируемой валидационной характеристике.

Диапазон измерений аналитической методики. Разработанная методика предназначена для количественного определения протеолитической активности лекарственного средства в интервале от 80 до 120 % от предполагаемого значения определяемой аналитической характеристики, и для проведения теста растворения лекарственного средства [10, 26] в диапазоне аналитической методики от 50 до 120 %.

Повторяемость аналитической методики. Валидационная характеристика повторяемость исследовалась на трех калибровочных растворах, расположенных в различных частях диапазона измерений аналитической методики в 5 повторностях. Таким образом были выбраны калибровочные растворы различных концентраций с порядковыми номерами 1, 3, 6. Для исследования повторяемости результатов пробоподготовки был проверен анализ модельного раствора лекарственного средства в 5 повторностях. Результаты исследования валидационной характеристики повторяемость представлены в Таблице 5.14.

Согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 5725-2002 нужно рассчитать «предел прецизионности» [5]. Методика определения характеристики описна в разделе 5.1.1. Максимально допустимая неопределенность результата Δ_{AS} была рассчитана на совании спецификации химопсина, по которой активность протеолитического фермента составляет 15-25 МЕ. Согласно пересчету в проценты, эта величина принимает вид 75-125 %. Для калибровочных растворов точность разведения должна быть 99-101 %. Результаты статистической обработки представлены в Таблице 5.15.

Максимально допустимая неопределенность результата $\Delta_{AS} = 8 \%$ для модельного раствора и $\Delta_{AS} = 0,32 \%$ для калибровочных растворов. Двусторонний доверительный интервал Δz не более 0,32 %, что не превышает максимально допустимую неопределенность результатов анализа, следовательно, выборку можно считать однородной [48].

В результате валидации методики контроля качества по показателю количественное определение протеолитической активности в ЛФ доказано, что при выполнении испытаний одним и тем же аналитиком в одних и тех же условиях в течение короткого промежутка времени, получаются близкие по значению результаты. Относительное стандартное отклонение не превышает 0,32 %.

Таблица 5.14 – Оценка валидационной характеристики повторяемость

	Концентрация стандартного раствора, мг/мл			Концентрация модельного раствора, мг/мл
	0,6000	2,5000	10,0000	9,0000
	№ калибровочного раствора			Количество фермента, МЕ
	1	3	5	640
Проба №	Абсорбция			
1	0,1369	0,4645	1,8283	0,6001
2	0,1371	0,4676	1,8251	0,5986
3	0,1388	0,4665	1,8267	0,5937
4	0,1392	0,4669	1,8272	0,5944
5	0,1408	0,4653	1,8289	0,5996
Метрологические измерения				
Среднее значение	0,1386	0,4662	1,8272	1,6455
Стандартное отклонение	0,00104	0,00125	0,00148	0,00301
RSD, %	0,75348	0,26776	0,08095	0,50358

Таблица 5.15 – Результаты вычислений всех метрологических параметров для оценки характеристики повторяемость для калибровочных и модельных растворов

P-p	A _i	\bar{A}	S ² _x	$\sum d_i^2$	S _x	S _r	RSD, %	Δz , %
КО1	0,1369	0,1386	1,09×10 ⁻⁶	0,00125	0,00104	0,00753	0,753486	0,001096
	0,1371							
	0,1388							
	0,1392							
	0,1408							
КО3	0,4645	0,4662	1,56×10 ⁻⁶	0,00101	0,00125	0,002678	0,26776	0,00131
	0,4676							
	0,4665							
	0,4669							
	0,4653							
КО5	1,8283	1,8272	2,19×10 ⁻⁶	0,00109	0,00148	0,00081	0,08095	0,001552
	1,8251							
	1,8267							
	1,8272							
	1,8289							
МО	0,6001	0,5973	9,05×10 ⁻⁶	0,00258	0,00301	0,00504	0,50359	0,00310
	0,5986							
	0,5937							
	0,5944							
	0,5996							

Примечания: A_i – значение абсорбции i компонента; \bar{A} – среднее значение; $\sum d_i^2$ – среднее квадратичное отклонение, S²_x – дисперсия; S_x – стандартное отклонение; S_r – Относительное стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; Δz – Односторонний доверительный интервал. КО – калибровочный раствор; МО – модельный образец.

Промежуточная прецизионность аналитической методики. Валидационная характеристика повторяемость исследовалась на трех калибровочных растворах, расположенных в различных частях диапазона измерений аналитической методики тремя химиками-аналитиками. Таким образом были выбраны калибровочные растворы различных концентраций с порядковыми номерами 1, 3, 5. Также для исследования повторяемости результатов пробоподготовки был проверен анализ модельного раствора лекарственного средства двумя химиками-аналитиками. Результаты исследования промежуточной прецизионности представлены в Таблицах 5.16. и 5.17.

Таблица 5.16 – Оценка промежуточной прецизионности для химика- аналитика 1

	Концентрация стандартного раствора, мг/мл			Концентрация модельного раствора, мг/мл
	0,6000	2,5000	10,0000	3,2030
	Номер калибровочного раствора			Количество фермента, МЕ
	1	3	5	640
	Абсорбция			
Химик- аналитик 1	0,1369	0,4645	1,8283	0,6001
	0,1371	0,4676	1,8251	0,5986
	0,1388	0,4665	1,8267	0,5937
	0,1392	0,4669	1,8272	0,5944
	0,1408	0,4653	1,8289	0,5996
	Метрологические измерения			
Среднее значение	0,1386	0,4662	1,8272	0,5973
Стандартное отклонение	0,00104	0,00125	0,00148	0,00301
RSD, %	0,75348	0,26776	0,08095	0,50358

Таблица 5.17 – Оценка промежуточной прецизионности для химика-аналитика 2

	Концентрация стандартного раствора, моль/л			Концентрация модельного раствора, мг/мл
	0,6000	2,5000	10,0000	3,2030
	Номер калибровочного раствора			Количество фермента, МЕ
	1	3	5	640
	Абсорбция			
Химик- аналитик 2	0,1388	0,4672	1,8285	0,5983
	0,1372	0,4663	1,8248	0,5978
	0,1401	0,4649	1,8252	0,5934
	0,1387	0,4658	1,8289	0,6004
	0,1374	0,4645	1,8267	0,5990
	Метрологические измерения			
Среднее значение	0,1384	0,4657	1,8268	0,5978
Стандартное отклонение	0,00118	0,00108	0,00186	0,00264
RSD, %	0,852538	0,232544	0,101925	0,441076

Относительное стандартное отклонение результатов испытаний, полученных двумя химиками-аналитиками, имеют значение менее 2,7 % [48]. Для сравнения дисперсий вариационного ряда, полученных для результатов каждого химика-аналитика, использовали критерий Фишера (F). Результаты вычислений оформлены в Таблице 5.18.

Критическое значение Фишера определено по Таблице, учитывая доверительный интервал (P) и число степеней свободы (n-1) [48]. Табличное значение критерия Фишера $F_{(0,95;5;5)} = 5,05$. Затем, используя критерий Фишера, сравнили дисперсии, вычисленные для результатов каждого химика-аналитика, с Табличным значением.

Таблица 5.18 – Результаты вычислений критерия Фишера

Р-р	Химик- аналитик 1 (S^2_1)	Химик- аналитик 2 (S^2_1)	F_1
КО1	$1,09 \times 10^{-6}$	$1,39 \times 10^{-6}$	0,5621
КО3	$1,55 \times 10^{-6}$	$1,17 \times 10^{-6}$	0,7899
КО5	$2,19 \times 10^{-6}$	$3,46 \times 10^{-6}$	0,6665
МО	$9,05 \times 10^{-6}$	$6,95 \times 10^{-6}$	0,8047

Примечания: S^2_x – дисперсия; F – критерий Фишера; КО – калибровочный раствор; МО – модельный образец.

Все полученные значения меньше критического значения критерия Фишера, определенного по Таблице. Следовательно, дисперсии различаются незначительно, и можно сравнивать средние значения внутри одной концентрации, рассматривая значения каждой группы как отдельную выборку [48].

Была проведена оценка выборки средних значений на однородность. Для этого, для результатов испытаний, полученных каждым химиком-аналитиком, была вычислена средневзвешенная дисперсия и критерий Стьюдента [48]. В результате математической обработки данных получили результаты вычислений, которые внесены в Таблицу 5.19.

Таблица 5.19 – Результаты вычислений средневзвешенной дисперсии и критерии Стьюдента

Образец	Химик-аналитик	S^2_x	n_1	n_2	t
КО1	ХА1	$1,09 \times 10^{-6}$	5	5	0,9029
	ХА2	$1,39 \times 10^{-6}$			
КО3	ХА1	$1,55 \times 10^{-6}$			0,6235
	ХА2	$1,17 \times 10^{-6}$			
КО5	ХА1	$2,19 \times 10^{-6}$			0,5698
	ХА2	$3,46 \times 10^{-6}$			
МО	ХА1	$9,05 \times 10^{-6}$	0,7387		
	ХА2	$6,95 \times 10^{-6}$			

Примечания: S^2_x – дисперсия; F – критерий Фишера; КО – калибровочный раствор; МО – модельный образец, ХА – химик- аналитик.

Сравнили вычисленные значения критерия Стьюдента с Табличным $t_{0,95;10} = 2,23$. Все вычисленные значения не превышают Табличного значения. Следовательно, между средним арифметическим значением результатов испытаний двух химиков-аналитиков нет значимых различий [48].

Линейность аналитической методики. Для доказательства линейности аналитической методики были проанализированы калибровочные растворы, концентрации которых представлены в Таблице 5.1. Результаты исследования представлены в Таблице 5.20. и Рисунке 5.4. По результатам полученных данных построен график, для визуальной оценки линейности. Для оценки линейности рассчитан коэффициент корреляции, который равен 0,9998. Для оценки характеристики линейности были получены параметры согласно уравнению функции прямой $y=k \times x+a$. Определена точка пересечения с осью ординат a , которая равна 0,0149, и тангенс угла наклона прямой k , который равен 0,1809.

Коэффициент корреляции отражает линейную зависимость полученной абсорбции от количественного определения протеолитической активности в модельном растворе. Коэффициент корреляции составляет не менее 0,99, что соответствует требованиям ГФ РФ [10, 48].

Таблица 5.20 – Результаты вычислений параметров для оценки линейности

№	Содержание определяемого вещества, мг/мл	Абсорбция	Среднее значение абсорбции	Метрологические измерения	
				$\sum d_i^2$	
1	0,6000	0,1369	0,1386	$\sum d_i^2$	0,00125
		0,1371		S_x^2	$1,09 \times 10^{-6}$
		0,1388		S_x	0,00104
		0,1392		S_r	0,00753
		0,1408		RSD, %	0,75348
2	1,2000	0,2171	0,2198	$\sum d_i^2$	0,00166
		0,2221		S_x^2	$4,42 \times 10^{-6}$
		0,2186		S_x	0,00210
		0,2217		S_r	0,001346
		0,2196		RSD, %	0,956085
3	2,5000	1,6234	0,4662	$\sum d_i^2$	0,00101
		1,6211		S_x^2	$1,56 \times 10^{-6}$
		1,6245		S_x	0,00125
		1,6253		S_r	0,00268
		1,6202		RSD, %	0,26776
4	5,0000	0,9124	0,9135	$\sum d_i^2$	0,00166
		0,9108		S_x^2	$6,38 \times 10^{-6}$
		0,9119		S_x	0,00253
		0,9166		S_r	0,002764
		0,9157		RSD, %	0,276445
5	10,0000	2,2528	1,8272	$\sum d_i^2$	0,00109
		2,2513		S_x^2	$2,19 \times 10^{-6}$
		2,2556		S_x	0,00148
		2,2540		S_r	0,00081
		2,2535		RSD, %	0,08095

Правильность аналитической методики: определялась по сериям образцов, состоящим из модельных образцов и калибровочного раствора стандартного образца (СО) тирозина № 1, 3 и 5. Также проводилась оценка правильности количественного определения модельного раствора содержащего протеолитический фермент в количестве 20 МЕ. Все образцы анализировались по 3 раза. Результаты испытаний и статистическая обработка результатов валидационной характеристики правильность представлены в Таблицах 5.21. - 5.23.

Таблица 5.21 – Оценка характеристики правильности для калибровочных растворов

	Концентрация стандартного раствора, мг/мл											
	0,6000				2,5000				10,0000			
	Номер калибровочного раствора											
	1				3				5			
	ИК	PK*	ε	КО	ИК	PK	ε	КО	ИК	PK*	ε	КО
1	0,5926	0,6000	98,77	0,1369	2,5075	2,500	100,30	0,4676	10,0093	10,000	100,09	1,8289
2	0,6095	0,6000	101,59	0,1408	2,4909	2,500	99,64	0,4645	9,9885	10,000	99,89	1,8251
3	0,6009	0,6000	100,14	0,1388	2,5038	2,500	100,15	0,4669	10,0000	10,000	100,00	1,8272
\bar{A}	100,17			0,1388	100,03			0,4663	99,99			1,8271
CO				0,00195				0,0016				0,00190
RSD				1,40472				0,3486				0,10418

Примечания: *PK – рассчитанная концентрация в ммоль/л, RSD – относительное стандартное отклонение, CO – стандартное отклонение, КО – Абсорбция, ИК – известная концентрация в ммоль/л, ε – точность в %, \bar{A} – среднее значение.

Таблица 5.22 – Оценка характеристики правильности для модельных растворов

	Концентрация модельного раствора, мг/мл				
	3,2030				
	Количество фермента, ME				
	640				
	ИК	PK*	ME	ε, %	КО
1	3,2180	3,2030	643,0002	100,47	0,6001
2	3,2100	3,2030	641,3929	100,22	0,5986
3	3,1837	3,2030	636,1426	99,40	0,5937
\bar{A}	100,03				0,5975
CO					0,00335
RSD %					0,005602

Примечания: *PK – рассчитанная концентрация в ммоль/л, RSD – относительное стандартное отклонение, CO – стандартное отклонение, КО – Абсорбция, ИК – известная концентрация в ммоль/л, ε – точность в %, \bar{A} – среднее значение.

Максимально допустимая неопределенность результата Δ_{AS} была рассчитана на основании требований ГФ РФ [10, 48]. Верхний предел методики определения ФС (V_H) должен иметь значения 101 %, а нижний предел (V_L) – 99 %. Поэтому величина Δ_{AS} имеет значение 0,32.

Систематическая составляющая неопределенности $\delta \% = 0,1024$. Сравнивали значения максимально допустимой неопределенности анализа и фактически вычисленное значение в ходе испытаний каждой группы концентраций: $0,1024 \geq \frac{\Delta z}{\sqrt{n}}$. Отклонение среднего значения для степени извлечения Z_{cp} от 100 % не превышает требования критерия статистической незначимости [48]. Следовательно, систематическая погрешность не является статистически отличимой от нуля.

Так как выполнялось требование к критерию статистической незначимости, дальнейшее использование критерия практической незначимости по сравнению с максимально допустимой неопределенностью анализа не применяли [146].

Таблица 5.23 – Результаты вычислений всех метрологических параметров для оценки характеристики повторяемости для калибровочных и модельных растворов

P-p	A_i	\bar{A}	S^2_x	$\sum d_i^2$	S_x	S_R	RSD, %	Δz
КО1	0,1369	0,1388	$3,80 \times 10^{-6}$	0,001311	0,00195	0,014047	1,404716	0,00205
	0,1408							
	0,1388							
КО3	0,4676	0,4663	$2,64 \times 10^{-6}$	0,001222	0,00163	0,003486	0,34864	0,00170
	0,4645							
	0,4669							
КО5	1,8289	1,8271	$3,62 \times 10^{-6}$	0,001311	0,00190	0,001042	0,104184	0,00199
	1,8251							
	1,8272							
МО	0,6001	0,5975	$1,12 \times 10^{-5}$	0,002511	0,003347	0,005602	0,560222	0,00351
	0,5986							
	0,5937							

Примечания: A_i – значение абсорбции i компонента; \bar{A} – среднее значение; $\sum d_i^2$ – среднее квадратичное отклонение, S^2_x – дисперсия; S_x – стандартное отклонение; S_R – Относительное стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; Δz – односторонний доверительный интервал. КО – калибровочный раствор; МО – модельный образец.

На основании экспериментальных данных, полученных в процессе валидации аналитической методики по показателю протеолитической активности в ЛФ методом спектрометрии в ультрафиолетовой области, доказано, что результаты испытаний соответствуют требованиям критериев приемлемости по всем изученным показателям, что подтверждает соответствие данной методики установленным критериям и позволяет контрольно-аналитической лаборатории корректно воспроизводить данную методику и получать достоверные результаты.

5.1.3. Методика качественного определения аскорбиновой кислоты

Методика качественного определения Аскорбиновая кислота определялась согласно ГФ РФ XIV ФС.2.1.0058.18 «Аскорбиновая кислота» раздел подлинность пункт №2 «Спектрофотометрия», согласно которому УФ-спектр в кислой среде должен иметь максимум поглощения 243 нм со снятием спектра в диапазоне 230-400 нм [10]. УФ-спектр аскорбиновой кислоты представлен на Рисунке 5.5.

Разработка аналитической методики качественного определения аскорбиновой кислоты. Данная методика требует модификации под ЛС «Порошок биоразлагаемый для

местного применения», так как ЛФ мешает определению. Поэтому требуется введение стадии осаждения всех компонентов ЛФ, кроме аскорбиновой кислоты. Было принято решение провести осаждение в щелочной среде, с последующей нейтрализацией и переводом в кислую среду для проведения анализа согласно ГФ РФ XIV ФС.2.1.0058.18 «Аскорбиновая кислота» [10]. Однако существует возможность проведения анализа с помощью метода ВЭЖХ, который основан на разделении веществ на колонке и дальнейшем детектировании при помощи различных детекторов, т.к. метод подходит для определения многокомпонентных смесей, таких как лекарственные средства. Однако высокоэффективные колонки, при помощи которых проводят исследование, очень легко загрязнить высокомолекулярными соединениями.

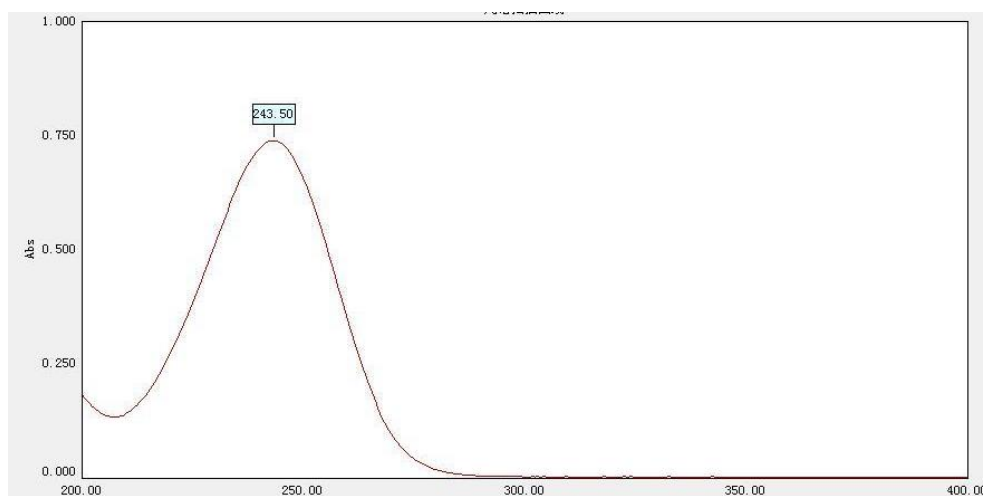


Рисунок 5.5 – Спектр аскорбиновой кислоты в ультрафиолетовой области в кислой среде

Детектирование зависит от физико-химических свойств аналита, в нашем случае аналит имеет поглощение в УФ-спектре. Также нужно понимание в каких концентрациях содержится соединение в пробе, от этого будет зависеть тип детектора. Самым оптимальным выбором для определения фармацевтических субстанций и других сопутствующих веществ в лекарственном средстве предпочтительно использовать ВЭЖХ-ДМД. Этот метод детектирования позволяет определить вещества, имеющие специфическое поглощение в УФ и видимом диапазоне длин волн. Однако метод ВЭЖХ дорогой в проведении, поэтому при выполнении научно-исследовательской работы был применен метод спектрофотометрии, который отвечает валидационной характеристике точность.

Для осуществления методики качественного определения аскорбиновой кислоты в вials на 10 мл вносили 5 мл воды, затем 0,1 г ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» и встряхнули. Добавили 5 мл раствора гидроксида натрия с концентрацией 1 моль/л, встряхнули и центрифугировали. 5 мл супернатанта перенесли в вial для проведения нейтрализации, добавили 3 мл раствора соляной кислоты с концентрацией 2 моль/л, отобрали аликвоту и поместили в кювету для спектрометрического анализа. Результатом анализа был максимум

поглощения 243 нм со снятием спектра в диапазоне 230-400 нм для растворов, содержащих аскорбиновую кислоту.

Валидация аналитической методики количественного определения аскорбиновой кислоты. Валидация аналитической методики качественного определения аскорбиновой кислоты выполнялось согласно Решению Коллегии ЕЭК от 17 июля 2018 г. N 113 по характеристикам, которые требуются для качественного определения, и в результате испытаний была исследована валидационная характеристика: специфичность [139].

Специфичность аналитической методики. При оценке характеристики специфичность определяли соответствие длины волны аскорбиновой кислоты у различных модельных образцов и раствора стандартного образца (СО). Также был анализирован образец плацебо, представляющий из себя дистиллированную воду. Результаты испытаний валидационной характеристики специфичность представлены в Таблице 5.24.

Таблица 5.24 – Результаты исследования характеристики специфичности методики

Образец	Экстремум абсорбции, нм	$\bar{X}_{cp} \pm S_x$
Модельный образец исследуемого раствора ЛФ	253	253±1
	254	
	252	
Калибровочный образец раствора СО	254	253±1
	252	
	253	
Модельный образец «Плацебо»	–	–

Как показывают результаты исследования характеристики специфичности методики, представленные в Таблице 5.25., наблюдается совпадение экстремума абсорбции при длине заданной волны. Также было обнаружено, что субстрат не оказывает влияния на качество полученных результатов, так как не содержит гидролизованных остатков серосодержащих аминокислот.

Совпадение полученных экстремумов функции двух образцов с различной концентрацией компонентов дает возможность сделать вывод: аналитическая методика качественного определения аскорбиновой кислоты позволяет получить специфичный результат определения и соответствует анализируемой валидационной характеристике.

5.1.4. Методика качественного определения хитозана

Проведение качественной реакции на хитозан, являющимся носителем действующих веществ лекарственного средства, необходимо по причине возможности изменения технологических параметров лекарственной формы при изменении состава ЛС.

Разработка методики качественного определения хитозана. Для проведения качественного анализа на основе химических взаимодействий была выбрана специфическая реакция на амидную группу при помощи проведения гидроксамовой пробы. Так как гидроксамовая проба протекает в щелочной среде с последующей нейтрализацией, в которой хитозан не растворим и выпадает в осадок, с последующей нейтрализацией полученного раствора, было принято решение о получении низкомолекулярного хитозана при помощи реакции с ферментом лизоцимом [75, 109].

Для осуществления методики проведения качественной реакции определения хитозана в ЛС, в виалу на 10 мл вносили 5 мл воды, затем добавляли 0,1 г хитозансодержащего ЛС и 0,01 мг ферментативного ЛС химопсин. Нагревали на предварительно нагретой до 30 °С водяной бане 10 минут. Добавляли 5 мл раствора гидроксида натрия с концентрацией 1 моль/л, встряхивали и центрифугировали. 3 мл супернатанта переносили в виалу для проведения реакции, добавляли 1 мл раствора щелочного гидроксиламина и переносили на кипящую водяную баню на 5 минут. Нейтрализацию раствора проводили соляной кислотой с концентрацией 2 моль/л и добавляли 0,5 мл раствора хлорида железа (III) в концентрации 0,1 моль/л. Результатом реакции должно быть красно-фиолетовое окрашивание раствора, полученного в ходе проведения методики качественного определения.

Валидация качественной методики определения хитозана. Валидация аналитической методики качественного определения хитозана выполнялась согласно Решению Коллегии ЕЭК от 17 июля 2018 г. N 113 по характеристикам, которые требуются для качественных испытаний. Поэтому в результате испытаний была исследована валидационная характеристика: специфичность [26].

Специфичность аналитической методики. При оценке характеристики специфичность определяют соответствие длинны волны серосодержащих аминокислот у различных модельных образцов и образцов растворов хитозана, которые образуются в результате реакции субстрата и фермента, а также образца плацебо. Результаты испытаний валидационной характеристики специфичность представлены в Таблице 5.25.

Таблица 5.25 – Результаты исследования характеристики специфичности методики

Образец	Окрашивание раствора
Модельный образец исследуемого раствора ЛФ	Красно-фиолетовое
	Красно-фиолетовое
	Красно-фиолетовое
Образец раствора аскорбата хитозана	Красно-фиолетовое
	Красно-фиолетовое
	Красно-фиолетовое
Образец раствора ацетата хитозана	Красно-фиолетовое
	Красно-фиолетовое
	Красно-фиолетовое
Модельный образец «Плацебо»	Не наблюдалось

Как показывают результаты исследования характеристики специфичности методики, представленные в Таблице 5.26., наблюдается совпадение экстремума абсорбции при длине заданной волны. Также было обнаружено, что субстрат не оказывает влияния на качество полученных результатов.

Совпадение полученной цветности трех образцов с различными растворимыми формами хитозана дает возможность сделать вывод, что аналитическая методика качественного определения хитозана позволяет получить специфичный результат определения, соответствующий анализируемой валидационной характеристике.

5.2. Разработка проекта спецификации лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Проект спецификации на лекарственное средство «Порошок биоразлагаемый для местного применения» был составлен впервые в соответствии с требованиями Федерального закона «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ, Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания, Фармакопеи ЕАЭС, Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 78 «О правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения», а также Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств, утвержденного Решением Коллегии ЕЭК от 17.07.2018 г. № 113 [1, 10, 22, 23, 26]. Для разработки проекта спецификации на лекарственное средство были проведены информационно-аналитические исследования требований как зарубежных, так и российских требований. Проект разработанной спецификации на лекарственное средство «Порошок биоразлагаемый для местного применения» представлена в Таблице 5.26.

Таблица 5.26 – Проект спецификации на ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

Показатель качества	Метод	Требования
Описание	Органолептический ОФС.1.1.0001.18	Порошок от белого до белого со слегка желтоватым оттенком цвета, со слабым характерным запахом
Подлинность	ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в УФ и видимой областях Органолептический ОФС.1.1.0001.18	ЛС должно давать положительный результат на качественное определение хитозана и аскорбиновой кислоты
Размер частиц	ОФС.1.1.0015.15 Ситовой анализ	При ситовом анализе размер частиц должен быть не более 160 мкм
Потеря массы при высушивании	ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании»	Значение показателя влажность $0,30 \pm 0,1$ %
Насыпная плотность	ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков»	Значение показателя насыпная плотность $257,0 \pm 1,5$ %
Однородность дозирования	ОФС.1.4.2.0009.15 Однородность массы дозированных лекарственных форм	Допустимое отклонение массы однократного применения – 10 % от средней массы. Масса одной дозы $131 \pm 13,10$ мг
Микробиологическая чистота	ОФС.1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность»	Категория 1
Количественное определение	ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в УФ и видимой областях	Активность ферментов должна составлять 95,00-105,00 % от дозы в лекарственном средстве
Упаковка	Флакон из полиэтиленового пластика (ПЭП) с дозатором диаметром 1 мм и внешней крышкой с контролем первого вскрытия.	
Маркировка	На первичной упаковке на русском языке указывают торговое наименование лекарственного средства, группировочное наименование, наименование лекарственной формы, дозировку, предприятие - изготовитель, его товарный знак, номер серии, дату изготовления и срок годности. На вторичной упаковке на русском языке указывают: наименование и товарный знак производителя, его адрес, контактные данные (телефон и e-mail), торговое наименование лекарственного средства, наименование лекарственной формы, дозировку, количество лекарственного средства в упаковке, состав, способ применения, дату выпуска, срок годности, условия хранения, условия отпуска из аптек, штрих-код, номер регистрационного удостоверения, предупредительную надпись: «Хранить в недоступном для детей месте».	
Хранение	При температуре не выше 25 °С в сухом месте.	
Срок годности	2 года	

5.3. Факторы, влияющие на перенос разработанных технологий и аналитических методик

Для осуществления трансфера методик количественного определения и технологии производства требуется обратить внимание на факторы системы ЛФ и их взаимосвязи, которые влияют на разработку и работоспособность методики или технологии получения. Одним из подходов к исследованию факторов влияющих на трансфер технологий является метод, который реализуется при помощи анализа рисков. Проведение анализа риска позволит выявить ключевые параметры при трансфере технологий и методик на другие производства и лаборатории, что позволит подготовить производственные площадки и аналитические лаборатории к трансферу технологий и методик.

Для проведения исследования требуется анализ разработок и установление причинно-следственных связей между факторами системы и результатом, который получается на выходе (готовый продукт или аналитическую методику). Для визуализации этого подхода предпочтительно использовать диаграмму Исикавы. Диаграммы Исикавы анализа рисков при переносе технологии получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» и аналитических методик представлены на Рисунках 5.6. и 5.7.

Для установления причинно-следственных связей было решено разделить факторы на группы. В технологии было решено следовать принципу, заложенному в разработанной технологической схеме производства и спецификации ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

Для аналитической методики в основные разделы были выделены следующие группы данных: характеристика АФС, включающая основную известную информацию о ферменте и продуктах реакции, пробоподготовку, детектирование, валидацию и верификацию. Каждый основной раздел содержит важные факторы, без учета которых перенос технологии или аналитической методики невозможен. Также по причине сложности установления взаимосвязи и важности влияния каждого описанного фактора было решено присвоить каждому фактору одинаковую силу влияния на конечный результат.

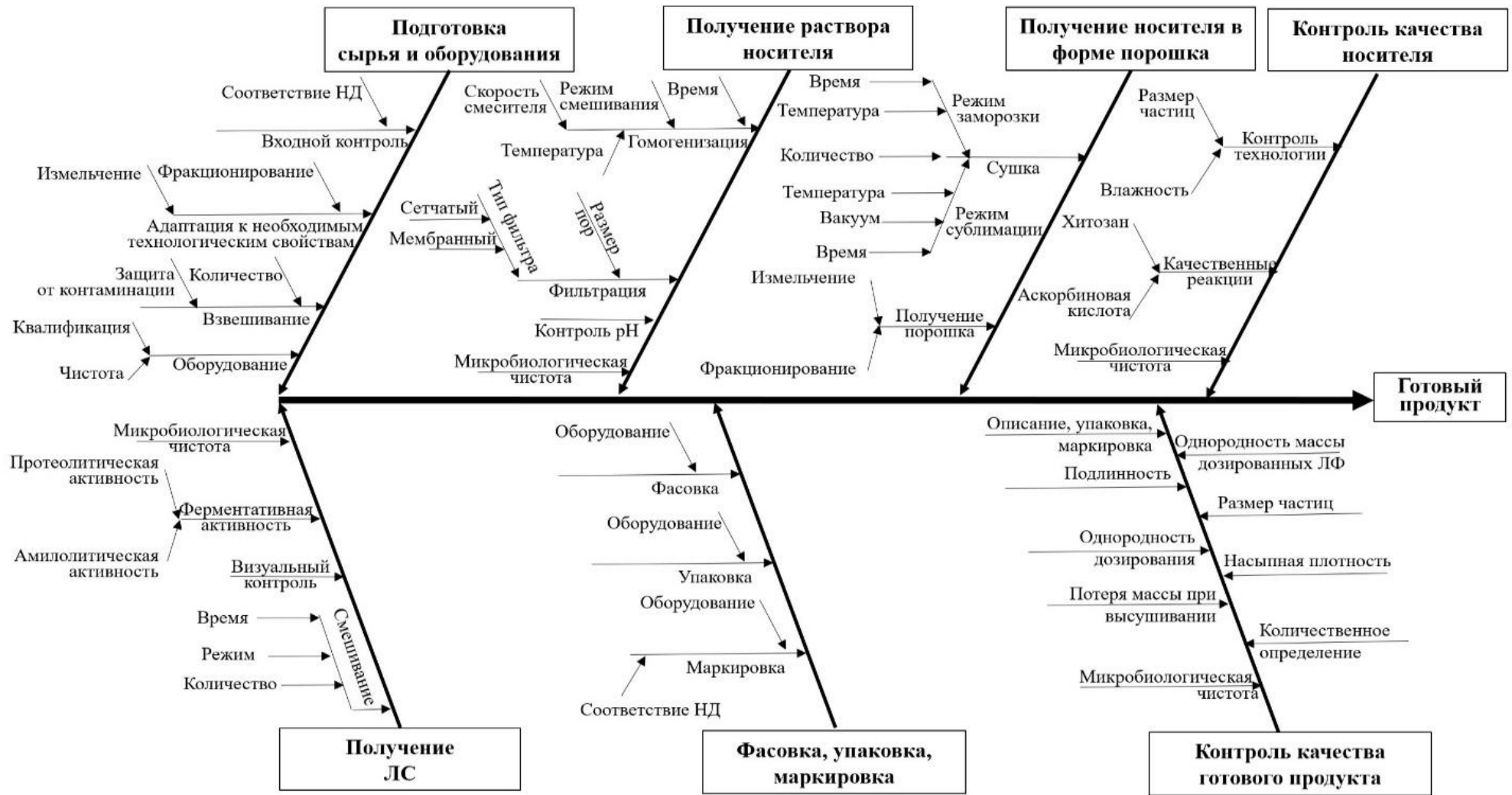


Рисунок 5.6 – Диаграмма анализа факторов рисков при переносе технологии получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»

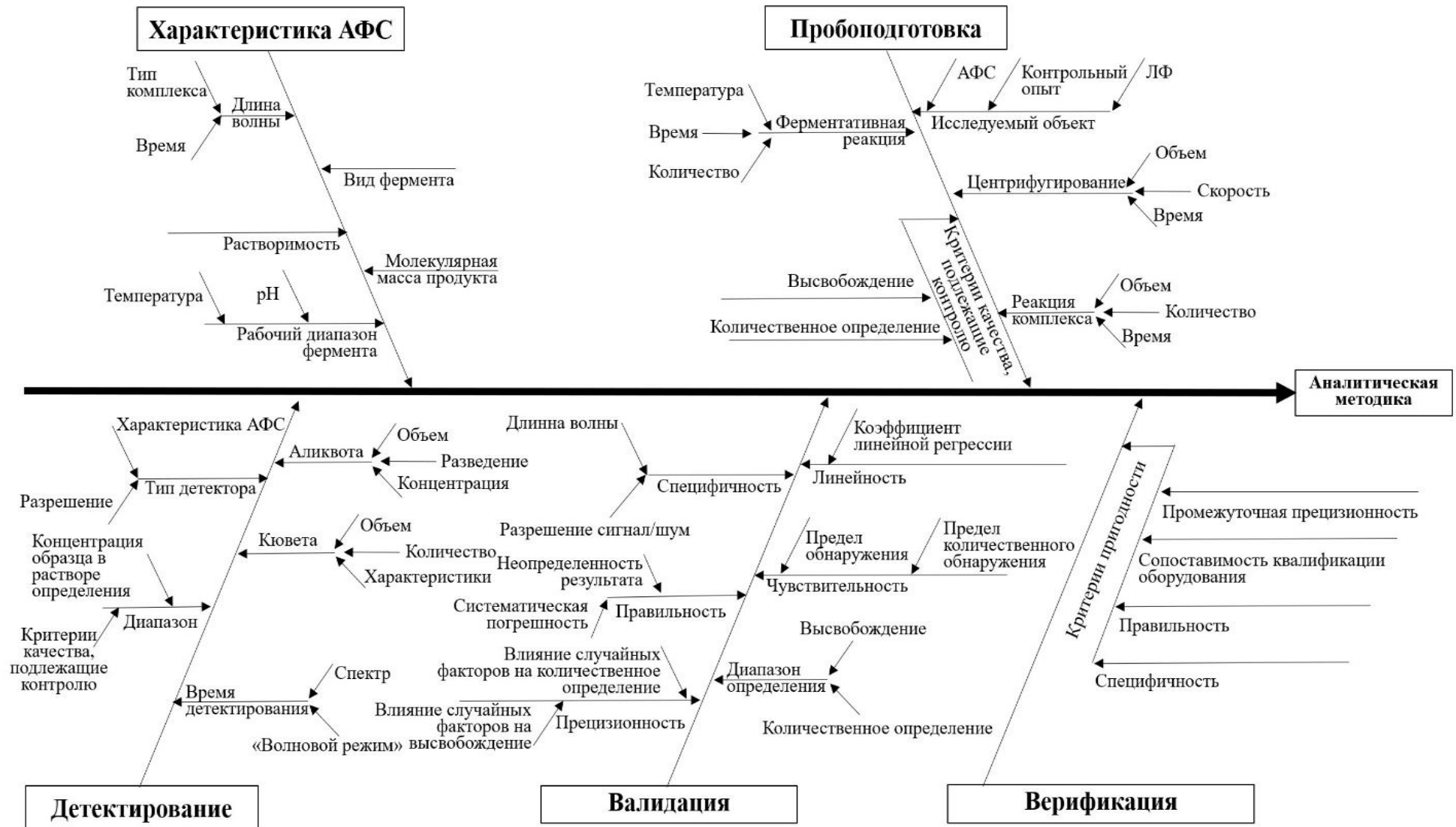


Рисунок 5.7 – Диаграмма анализа факторов рисков при переносе разработанных аналитических методик количественного определения

Таким образом проведенный анализ риска при переносе разработок показывает основные факторы, которые возможно назвать критическими точками, требующими внимательного подхода для переноса и масштабирования разработанных технологий и аналитических методик на производственные площадки.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

Разработана и оптимизирована аналитическая методика оценки протеолитической и амилолитической активностей для показателя количественное определение химопсина и гиалуронидазы в ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» методом спектофотометрии в УФ-диапазоне.

Аналитические методики исследования ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения» были валидированы согласно нормативным требованиям.

Разработан проект спецификации на ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения». Проведена оценка качества ЛС по следующим показателям: описание; подлинность; размер частиц; потеря массы при высушивании; насыпная плотность; однородность дозирования; микробиологическая чистота; количественное определение.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Анализ исследований в области разработок лекарственных средств на основе биоразлагаемых полимеров показал, что использование препаратов должно быть обусловлено сочетанием местного и резорбтивного действия при обеспечении высокой концентрации действующих веществ в месте непосредственного воздействия и безопасным. Использование хитозана в качестве носителя действующих веществ подтверждает интерес к данному полимеру, принимая во внимание его физико-химические свойства, возможность модификации и низкую токсичность.

2. Научно обоснован и экспериментально подтвержден выбор лекарственной формы – порошок для наружного применения. Установлены основные факторы, влияющие на фармацевтическую разработку ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения»: сыпучесть, оценка высвобождения при помощи фактора подобия, молекулярная масса хитозана, насыпная плотность.

3. На основании многофакторного анализа осуществлен выбор оптимального состава, проведены физико-химические, фармацевтико-технологические и биофармацевтические исследования свойств лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения». При планировании эксперимента был использован последовательный многофакторный анализ для установления зависимости между факторами и откликами для выбора оптимальной композиции. Была выбрана лекарственная форма в виде порошка для наружного применения, состоящего из гиалуронидазы и химопсина, и аскорбата хитозана в качестве биоразлагаемого полимера.

4. По результатам изучения фармацевтико-технологических характеристик предложена оптимальная технологическая схема получения ЛС «Порошок биоразлагаемый для местного применения». Для установления причинно-следственных связей между факторами производственного процесса и результатом была построена диаграмма Исикавы. При разработке ОПР были учтены критические параметры производственного процесса при переносе технологии.

5. Были разработаны и валидированы аналитические методики подлинности и количественного определения протеолитической и амилолитической активности ферментов, входящих в состав лекарственного средства. Проведены исследования стабильности, и установлен срок годности. Разработан проект спецификации, включающий следующие показатели: описание; подлинность; размер частиц; потеря массы при высушивании; насыпная

плотность; однородность дозирования; микробиологическая чистота; количественное определение.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВВ	–	Вспомогательные вещества
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ	–	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГОСТ	–	Межгосударственный стандарт
ЕЭК	–	Евразийская экономическая комиссия
ЕАЭС	–	Евразийский экономический союз
ГФ	–	Государственная фармакопея
ЛП	–	Лекарственный препарат
ЛС	–	Лекарственное средство
ЛФ	–	Лекарственная форма
МЕ	–	Международные единицы действия
МО	–	Модельный образец
НД	–	Нормативная документация
НПВС	–	Нестероидные противовоспалительные средства
ОФС	–	Общая фармакопейная статья
ПЭ	–	Полиэтиленовый пластик
СО	–	Стандартный образец
		Стандартное отклонение
ТХУ	–	Трихлоруксусная кислота
ТЭ	–	Тирозиновый эквивалент
УФ	–	Ультрафиолетовый
ФС	–	Фармацевтическая субстанция
		Фармакопейная статья
ХЧ	–	Химически чистый
ANOVA	–	(англ. analysis of variance) дисперсионный анализ
FDA	–	(англ. Food and Drug Administration) –Агентство по пищевым продуктам и лекарственным средствам США
ICH	–	(англ. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) – Международная конференция по гармонизации требований к регистрации лекарственным средствам для медицинского применения
RSD	–	Относительное стандартное отклонение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Российская Федерация. Законы. Об обращении лекарственных средств : Федеральный закон № 61-ФЗ : [принят Государственной думой 24 марта 2010 года : одобрен Советом Федерации 31 октября 2010 года] // Российская газета. – 2010. – 14 апреля. – Текст : непосредственный.
2. Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» : постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28 января 2021 года № 3. – Текст : электронный // Консультант : справочно-правовая система : сайт. – URL: <http://www.consultant.ru> (дата обращения: 10.03.2021). – Режим доступа: свободный.
3. ГОСТ Р 57129-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Часть 1. Изучение стабильности новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Общие положения : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : внесен Техническим комитетом по стандартизации ТК 458 «Разработка, производство и контроль качества лекарственных средств» : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 октября 2016 г. № 1344-ст : введен впервые : дата введения 2017-05-01 / подготовлен Государственным бюджетным образовательным учреждением высшего профессионального образования Первым московским государственным медицинским университетом имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Москва : Стандартинформ, 2019. – 15 с. – Текст : непосредственный.
4. ГОСТ 54330-2011. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилалитической активности : национальный стандарт Российской Федерации : официальное издание : внесен Техническим комитетом по стандартизации ТК 176 «Спиртовая, дрожжевая и ликероводочная продукция» : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 июня 2011 г. № 128-ст : введен впервые : дата введения 2013-01-01 / разработан Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом пищевой биотехнологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии). – Москва : Стандартинформ, 2012. – 14 с. – Текст : непосредственный.

5. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 5. Альтернативные методы определения прецизионности стандартного метода измерений. Государственный стандарт Российской Федерации : официальное издание : принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 23 апреля 2002 г. № 161-ст. : введен впервые : дата введения 2017-12-01 / разработан Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» Госстандарта России (ВНИИМС), Всероссийским научно-исследовательским институтом стандартизации (ВНИИ Стандарт), Всероссийским научно-исследовательским институтом классификации, терминологии и информации по стандартизации и качеству (ВНИИКИ). – Москва : ИПК Издательство стандартов, 2002. – 53 с. – Текст : непосредственный.

6. ГОСТ 6824-96. Глицерин дистиллированный : межгосударственный стандарт : издание официальное : внесен Госстандартом России ; принят Межгосударственным Советом по стандартизации, метрологии и сертификации от 4 октября 1996 г. № 10 : введен взамен ГОСТ 6824-76 : дата введения 1998-01-01 / разработан Всероссийским научно-исследовательским институтом жиров (ВНИИЖ) и Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 238 «Масла растительные и продукты их переработки». – Москва : ИПК Издательство стандартов, 1997. – 16 с. – Текст непосредственный.

7. ГОСТ 20264.2-88. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности (с изменением № 1) : межгосударственный стандарт : официальное издание : утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 2 марта 1988 г. № 440 : введен впервые : дата введения 1989-01-01 : ред. 2005-01-02 / разработан и внесен Министерством медицинской и микробиологической промышленности СССР. – Москва : ИПК Издательство стандартов, 2005. – 14 с. – Текст : непосредственный.

8. ГОСТ 14922-77. Аэросил : государственный стандарт СССР : издание официальное : утвержден и введен в действие Постановлением Госстандарта СССР от 01 января 1978 г № 4171 : введен впервые : дата введения 1978-01-01 ; ред. 1997-01-01 / разработан и внесен Министерством химической промышленности СССР. – Москва : ИПК Издательство стандартов, 1997. – 33 с. – Текст : непосредственный.

9. ГОСТ 21235-75. Тальк и талькомагнезит молотые: межгосударственный стандарт : издание официальное : утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 14 ноября 1975 г. № 2905 : введен впервые : дата введения 1997-01-01 ; ред. от 2003-12-01 / разработан и внесен Министерством промышленности строительных материалов СССР – Москва : ИПК Издательство стандартов, 2004. – 8 с. – Текст : непосредственный.

10. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV издание. – в 4-х томах : утверждена приказом Министерства здравоохранения 31 октября 2018 г. № 749 . – Текст : электронный // Консультант : справочно-правовая система : сайт. – URL: <http://www.consultant.ru> (дата обращения: 10.03.2021). – Режим доступа: свободный. [111]

11. Государственный Реестр лекарственных средств РФ : официальное издание : по состоянию на 14 марта 2020 года. – Текст : электронный / Министерство здравоохранения Российской Федерации : официальный сайт. – URL: <https://grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения: 14.03.2020)

12. Патент № 2240830 Российская Федерация, Пористые композиционные материалы на основе хитозана для заполнения костных дефектов : заявл. 26.12.2003 ; опубл. 27.11.2004 / С.Ф. Антонов [и др.] ; патентообладатель ФГУП Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов. – 13 с. – Текст : непосредственный.

13. Патент № 2376019 Российская Федерация, Пористые композиционные материалы на основе хитозана для заполнения костных дефектов : заявл. 26.12.2007 : опубл. 20.12.2009 / Баринов С.М. [и др.] ; патентообладатель Учреждение Российской академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена «Росмедтехнологий»). – Текст : непосредственный // Бюллетень. – № 35. – 8 с.

14. Патент № 2393228 Российская Федерация, Способ получения пищевых волокон : заявл. 25.07.2008 : опубл. 27.06.2010 / В.И. Попов [и др.] ; патентообладатель Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН). – Текст : непосредственный // Бюллетень. – № 18. – 6 с.

15. Патент № 2432156 С1 Российская Федерация, МПК А61К 9/06, А61К 36/42, А61К 47/34. Мазь для лечения ран : № 2010115217/15 : заявл. 19.04.2010 : опубл. 27.10.2011 / Михалев В. Ю. ; заявитель ООО «САЛЕН». – 5 с. – Текст непосредственный.

16. Патент № 2484811 Российская Федерация, МПК А61К 9/06(2006.01) А61К 38/43(2006.01) А61Р 17/02 Ферментный ранозаживляющий препарат : заяв. 15.08.2011 ; опубл. 20.06.2013. – Текст : электронный / Демина Н.С., Рототаев Д.А. ; патентообладатель ООО «Межотраслевая компания по науке и технологиям». – 6 с. – Текст : непосредственный.

17. Патент № 2681184 Российская Федерация, МПК А61F 13/00, А61L 15/16, А61К 31/722. Гемостатическая губка : № 2018107179 : заявл. 26.02.2018 : опубл. 04.03.2019 / Миляев А. В., Веретенников Е. А., Родигина А. О. [и др.] ; заявитель ООО «Спецмедтехника». – 6 с. –Текст непосредственный.

18. Патент № 2687102 Российская Федерация, Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза : заявл. 28.04.2018 ; опубл. 07.05.2019 / Пятигорская Н.В. [и др.] ; патентообладатель Федеральное государственное автономное

образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет). – Текст : непосредственный // Бюллетень. – № 13. – 2 с.

19. Патент № 2697869 Российская Федерация, Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза : заявл. 28.08.2018 ; опубл. 21.08.2019 / Пятигорская Н.В. [и др.] патентообладатель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет). – Текст : непосредственный // Бюллетень. – № 24. – 2 с.

20. Patent N CN101278896 PRC, A61K 9/00; A61K 33/38; A61K 47/34; A61K 47/38; A61P 15/00; A61P 15/02; A61P 17/02; A61K 31/722, Chitosan nano silver gel agent and uses thereof : app. 23.05.2008 ; pub. 14.12.2012 / Xie S., Zou F., Li Ch. ; assignee Sexes Biological Technology Co Ltd. – Текст : электронный // Patents.google.com : site. – URL: <https://patents.google.com/patent/CN101278896B/en?q=101278896> (дата обращения: 10.03.2020). – Режим доступа : свободный.

21. Patent N PT844868E Portugal, IPC A61K 9/00; A61K 9/08; A61K 47/36; C08L 5/08, Composicoes contendo o-carboxialquil quitosano e utilizacao em oftalmologia : app. 08.06.1996 ; pub. 28.03.2002 / Yen Sh., Reed K. ; assignee Novartis Ag. – Текст : электронный // Patents.google.com : site. – URL: <https://patents.google.com/patent/PT844868E> (дата обращения: 10.03.2020). – Режим доступа : свободный.

22. О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения : решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78. – Текст : электронный // Евразийский экономический союз : официальный сайт. – URL: <https://login.consultant.ru/link/?req=doc&demo=2&base=LAW&n=359911&dst=100007&field=134&date=18.06.2022http://www.eaeunion.org> (дата обращения: 10.03.2020). – Режим доступа : свободный.

23. О Фармакопее Евразийского экономического союза : решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100. – Текст : электронный // Евразийский экономический союз : официальный сайт. – URL: <https://login.consultant.ru/link/?req=doc&demo=2&base=LAW&n=359911&dst=100007&field=134&date=18.06.2022http://www.eaeunion.org> (дата обращения: 10.09.2020). – Режим доступа : свободный.

24. О Фармакопее Евразийского экономического союза : решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85. – Текст : электронный // Евразийский экономический союз: официальный сайт. – URL:

<https://login.consultant.ru/link/?req=doc&demo=2&base=LAW&n=359911&dst=100007&field=134&date=18.06.2022><http://www.eaeunion.org> (дата обращения: 10.09.2020). – Режим доступа: свободный.

25. Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза : решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 77. – Текст : электронный // Евразийский экономический союз : официальный сайт. – URL:<https://login.consultant.ru/link/?req=doc&demo=2&base=LAW&n=359911&dst=100007&field=134&date=18.06.2022><http://www.eaeunion.org> (дата обращения: 10.03.2020). – Режим доступа: свободный.

26. Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств : решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. № 113. – Текст : электронный // Евразийский экономический союз : официальный сайт. URL:<https://login.consultant.ru/link/?req=doc&demo=2&base=LAW&n=359911&dst=100007&field=134&date=18.06.2022><http://www.eaeunion.org> (дата обращения: 10.03.2020). – Режим доступа: свободный.

27. Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций : решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10 мая 2018 г. № 69 (ред. от 30.06.2020). – Текст : электронный // Евразийский экономический союз : официальный сайт. – URL: <https://login.consultant.ru/link/?req=doc&demo=2&base=LAW&n=359911&dst=100007&field=134&date=18.06.2022><http://www.eaeunion.org> (дата обращения: 10.09.2020). – Режим доступа: свободный.

28. Испытание новых лекарственных веществ и препаратов на стабильность ICH (Q1A R2) : гармонизированное трехстороннее руководство ICH : от 6 февраля 2003 г. – Текст : электронный // Международный совет по гармонизации технических требований к лекарствам для медицинского применения (ICH). – 20 с. – URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3520/> (дата обращения: 03.03.2020).

29. Фармацевтическая разработка ICH (Q8 P2) : гармонизированное трехстороннее руководство ICH : от 1 августа 2009 г. – Текст : электронный // Международный совет по гармонизации технических требований к лекарствам для медицинского применения (ICH). – 25 с. – URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3614/> (дата обращения: 03.03.2020).

30. Беланова, А. И. Сравнение подходов к изучению стабильности лекарственных средств в рамках национальной процедуры в России и Евразийском экономическом союзе / А. И. Беланова, Е. Л. Ковалева, Л. И. Митькина. – Текст : электронный // Ведомости Научного центра

экспертизы средств медицинского применения. – 2021. – Т. 11, № 1. – С. 16-23. – DOI 10.30895/1991-2919-2021-11-1-16-23.

31. Биологическая активность олигомеров хитозана / А.Б. Шиповская, В.И. Фомина, М. Н. Киреев [и др.]. – Текст : непосредственный // Известия Саратовского университета. – 2008. – Т. 8, № 2. – С. 46-49.

32. Блатун, Л. А. Местное медикаментозное лечение ран / Л. А. Блатун. – Текст : непосредственный // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – 2011. – № 4. – С. 51-59.

33. Большаков, И. Н. Исследование пролиферативной активности фибробластов мышцы, культивируемых на коллаген- хитозановых подложках. Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана : материалы VII Международной конференции / И. Н. Большаков, А. В. Еремеев, Е. В. Рожкова. – Текст : непосредственный. – Москва : ВНИРО. – 2003. – С.140-144.

34. Бркич, Л. Л. Разработка состава и технологии получения комбинированного лекарственного препарата на основе хитозансодержащих фармацевтических субстанций : специальность 14.04.01 : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Бркич Лилиана Любановна. – Москва, 2020. – 24 с. – Текст : непосредственный.

35. Буденовский, С. В. Новые раневые покрытия, содержащие серотонин и трипсин, в лечении экспериментальных гнойных ран (экспериментальное исследование) : специальность 14.00.27 : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Буденовский Сергей Валериевич. – Москва, 2006. – 26 с. – Текст : непосредственный.

36. Варфоломеев, С. Д. Химическая энзимология : учебник / С. Д. Варфоломеев. – Москва : Академия, 2005. – 471 с. – Текст : непосредственный.

37. Влияние кислотно-основного состояния среды на течение раневого процесса при сахарном диабете / В. Л. Фаттахов, Ю. С. Винник, О. В. Теплякова, А. В. Блескина. – Текст : непосредственный // Сибирское медицинское обозрение. – 2009. – № 6(60). – С. 35-38.

38. Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях / С. Н. Куликов, С. Н. Чирков, А. В. Ильина, С. А. Лопатин. – Текст : непосредственный // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т.42, № 2. – С.224-228.

39. Влияние хитозан-коллагенового комплекса с наночастицами серебра на течение раневого процесса в эксперименте / А. И. Бежин, В. А. Липатов, Э. В. Фрончек [и др.]. – Текст : непосредственный // Человек и его здоровье. – 2019. – № 2. – С.5-17.

40. Гальбрайх, Л. С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Л. С. Гальбрайх. – Текст : непосредственный // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 1. – С. 51-56.

41. Гильдеева, Г. Н. Формирование междисциплинарного подхода к стандартизации и контролю качества воспроизведенных лекарственных средств и преквалификационной экспертизе лекарственных препаратов : специальность 14.03.06 : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Гильдеева Гэлия Нязыфовна. – Волгоград, 2017. – 358 с. – Текст : непосредственный.
42. Гостищев, В. К. Общая хирургия : монография / В. К. Гостищев. – 2-е издание, переработанное и дополненное. – Москва : Медицина, 1997. – 671 с. – Текст : непосредственный.
43. Григорьян, А. Ю. Местное лечение гнойных ран препаратами на основе энтеросгеля : специальность 14.01.17 : автореферат диссертации кандидата медицинских наук / Григорьян Арсен Юрьевич. – Курск, 2011. – 22 с. – Текст : непосредственный.
44. Григорян, Л. Г. Разработка технологии и стандартизация дозированных порошков синбиотиковна основе бифидобактерий : специальность 14.04.01 : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Григорян Людмила Георгиевна. – Пермь, 2013. – 128 с. – Текст : непосредственный.
45. Гришин, А. А. Хитин и хитозан: химия, биологическая активность, применение / А. А. Гришин, Н. В. Зорина, В. И. Луцкий. – Текст : непосредственный // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2014. – Т. 7, № 1. – С. 29-34.
46. Ежова, Е. А. Обоснование и разработка технологии пищевого хиозана и препаратов на его основе : специальность 05.18.04 : диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук : защищена 23.09.2005 / Ежова Елена Анатольевна. Москва : ВНИРО, 2005. – 127 с. – Текст : непосредственный.
47. Зубов, Н. Н. Методы многомерного статистического анализа данных в медицине : учебное пособие / Н. Н. Зубов, В. И. Кувакин. – Санкт-Петербург : Литография Принт, 2017. – 348 с. – Текст : непосредственный.
48. Зырянов, О. А. Разработка состава и технологии получения лекарственной формы на основе триазатрициклотетрадекана потенциального модулятора АМРА-рецептора : специальность 14.04.01 : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Зырянов Олег Анатольевич. – Москва, 2021. – 186 с. – Текст : непосредственный.
49. Изучение адьювантных свойств низкомолекулярных хитозанов / Л. Г. Алексева, Е. В. Свирцевская, А. В. Ильина, С. А. Лопатин. – Текст : непосредственный // Современные проблемы дерматовенерологической иммунологической врачебной косметологии. – 2006. – Т.1. – С.45-51.
50. Изучение ранозаживляющего действия геля на основе хитозана с таурином и аллантоином / П. А. Федосов, А. И. Сливкин, В. А. Николаевский [и др.]. – Текст : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 572.

51. Изучение стабильности суппозиторий с пантогамом / Н. С. Назаренко, Д. П. Могилевский, А. С. Володина, А. И. Сливкин. – Текст : непосредственный // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2008. – № 1. – С. 154-158.
52. Имобилизованные формы антисептиков для лечения гнойных ран в эксперименте / А. Ю. Григорьян, А. И. Бежин, Т. А. Панкрушева [и др.]. – Текст : непосредственный // Человек и его здоровье. – 2011. – № 4. – С.24-33.
53. Использование хитозана в качестве носителя протеиназ и мирамистина для получения ферментсодержащего геля / Э. Э. Досадина, Л. Л. Бркич, Н. В. Пятигорская [и др.]. – Текст : непосредственный // Бутлеровские сообщения. – 2016. – Т.48, № 10. – С. 49-59.
54. Исследование антибактериального эффекта губок, содержащих наночастицы серебра / В. В. Пальчикова, Т. И. Кузнецова, М. Г. Гордиенко. – Текст : непосредственный // Успехи в химии и химической технологии. – 2017. – Т. 31, № 9. – С. 20-22.
55. Кlicheва, О. Б. Реакции карбоксиметилирования хитозана *Bombux mori* / О. Б. Кlicheва, С. Ш. Рашидова. – Текст : непосредственный // Вестник Тверского государственного университета. – 2016. – № 1. – С. 133-139.
56. Коллагеназы в медицинской практике: современные средства на основе коллагеназы и перспективы их совершенствования / А. В. Майорова, Б. Б. Сысуев, Ю. О. Иванкова, И. А. Ханалиева. – Текст : электронный // Фармация и фармакология. – 2019. – № 5. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kollagenazy-v-meditsinskoj-praktike-sovremennye-sredstva-na-osnove-kollagenazy-i-perspektivy-ih-sovershenstvovaniya> (дата обращения: 16.02.2021).
57. Компанцев, Д. В. Экспериментально-теоретическое обоснование совершенствования технологии глюкозамина и разработка для него эффективных лекарственных форм : специальность 14.04.01 : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Компанцев Дмитрий Владиславович. – Пятигорск, 2013. – 485 с. – Текст : непосредственный.
58. Кудыкин, М. Н. Повидон-йод в основе лечения инфицированных ран / М. Н. Кудыкин. – Текст : непосредственный // Русский медицинский журнал. – 2013. – № 34. – С.1755.
59. Куликов, С. Н. Влияние структуры на биоцидные свойства хитозанового полимера / С. Н. Куликов, Р. З. Хайруллин. – Текст : непосредственный // Вестник технологического университета. – 2016. – Т.19, № 6. – С. 152-155.
60. Кулиш, Е. И. Пленки биомедицинского назначения на основе хитозана / Е. И. Кулиш, В. В. Чернова, С. В. Колесов. – Текст : непосредственный // Вестник Башкирского университета. – 2007. – Т.12, № 3. – С.23-25.

61. Лайкер, Дж. Дао «Toyota»: 14 принципов менеджмента ведущей компании мира / Дж. Лайкер; перевод с английского. – Москва: Альпина Бизнес Букс, 2005. – 402 с. – (Серия «Модели менеджмента ведущих корпораций»). – Текст: непосредственный.
62. Лечебные гидрогелевые материалы различной степени структурирования на основе природных полимеров / М. И. Валугева, Т. С. Хлыстова И. В. Гусев, Н. Д. Олтаржевская. – Текст: непосредственный // Известия высших учебных заведений. Технология легкой промышленности. – 2012. – Т. 17, № 3. – С. 59-61.
63. Лозбина, Н. В. Свойства хитозана и его применение в офтальмологии / Н. В. Лозбина, И. Н. Большаков, В. И. Лазаренко. – Текст: непосредственный // Сибирское медицинское обозрение. – 2015. – № 5. – С. 5-13.
64. Лябин, М. П. Совершенствование технологии получения хитозана / М. П. Лябин, П. С. Семенов. – Текст: непосредственный // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11. – 2011. – № 2 (2). – С. 17-21.
65. Медушева, Е. О. Разработка, экспериментальное обоснование и внедрение в хирургическую практику раневых покрытий с комплексным некролитическим, антимикробным и антиоксидантным действием (экспериментальное исследование: специальность 14.00.27: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Медушева Елена Олеговна. – Москва, 2004. – 371 с. – Текст: непосредственный.
66. Местные гемостатические средства и пути их совершенствования / Е. В. Будко, Д. А. Черникова, Л. М. Ямпольский, В. Я. Яцюк. – Текст: электронный // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2019. – Т. 27, № 2. – С. 274-285. – DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272274-285.
67. Местные гемостатические средства и пути их совершенствования / Е. В. Будко, Д. А. Черникова, Л. М. Ямпольский, В. Я. Яцюк. – Текст: непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – Рязань. – 2019. – Т. 27, № 2. – С. 274-285.
68. Микроскопические методы определения размеров частиц дисперсных материалов: учебное пособие / Н. Н. Гаврилова, В. В. Назаров, О. В. Яровая. – Москва: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2012. – 52 с. – Текст: непосредственный.
69. Можина, Н. В. Коллагенолитические ферменты патогенных микроорганизмов / Н. В. Можина, Г. Н. Руденская. – Текст: непосредственный // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50, № 6. – С. 539-553.
70. Морозов, Ю. А. Разработка состава и фармакотехнологическое исследование трансдермальной лекарственной формы гиполипидемического действия с диизопропиламмония дихлорацетатом: специальность 15.00.01: автореферат диссертации на соискание ученой

степени кандидата фармацевтических наук / Морозов Юрий Алексеевич. – Пятигорск, 2008. – 23 с. – Текст : непосредственный.

71. Морфологические особенности процессов регенерации ран при лечении коллаген-хитозановыми и желатин-хитозановыми губками / С. Ф. Антонов, Б. А. Парамонов, Б. А. Никонов [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. – 2012. – Т.4, № 2. – С.43-46.

72. Мочалова, М. С. Исследование процесса получения частиц аэрогеля на основе хитозана для применения их в качестве кровоостанавливающих средств / М. С. Мочалова, Д. Д. Ловская, Н. В. Меньшутина. – Текст : непосредственный // Успехи в химии и химической технологии. – 2020. – Т. 34, № 8. – С. 95-97.

73. Мукатова, М. Д. Качественные характеристики хитина и хитозана, полученных из панцирьсодержащих отходов речных раков / М. Д. Мукатова, Н. А. Киричко, Е. Н. Романенкова. – Текст : непосредственный // Вестник МГТУ. – 2015. – Т. 18, № 4. – С. 641-646.

74. Муринов, К. Ю. Выделение хитозана из природного сырья / К.Ю. Муринов, Ю. Б. Монаков. – Текст : непосредственный // Вестник Башкирского Университета. Башкирия. – 2003. – № 1. – С. 30-33.

75. Немцев, С. В. Комплексная технология хитина и хитозана из панциря ракообразных / С. В. Немцев. – Москва : ВНИРО, 2006. – 134 с. – Текст : непосредственный.

76. Новые материалы медицинского назначения с комплексным пролонгированным действием на основе волокнообразующих полимеров / Е. О. Медушева, В. Н. Филатов, В. В. Рыльцев [и др.]. – Текст : непосредственный // Химические волокна. – 2007. – № 4. – С. 7-9.

77. Опыт применения аскорбата хитозана в комплексной терапии заболеваний пародонта / Н. В. Булкина, А. П. Ведяева, Е. В. Токмакова, О. В. Попкова. – Текст : непосредственный // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. – Т. 9, № 3. – С. 372-375.

78. Особенности биотехнологий клостридиальных коллагеназ – перспективных ферментов медицинского назначения / А. Д. Конон, С. В. Петровский, М. Ю. Шамбурова, А. В. Уварова. – Текст : непосредственный // Медицина экстремальных ситуаций. – 2016. – № 2 (56). – С. 45-58.

79. Перспективные сорбционные матрицы для конструирования антитоксического холерного энтеросорбента / Т. В. Аленкина, М. В. Овчинникова, М. Н. Киреев, А.К. Никифоров. – Текст : непосредственный // Биотехнология. Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 2. – С. 66-69.

80. Пивоварова, Н. С. Разработка состава и технологии адаптогенных дентальных плёнок на основе биомассы полисциаса : специальность 14.04.01 : диссертация на соискание

ученой степени кандидата фармацевтических наук / Пивоварова Надежда Сергеевна. – Санкт-Петербург, 2016. – 142 с. – Текст : электронный.

81. Полимеры в лечении ран: реалии и горизонты / О. А. Легонькова, М. С. Белова, Л. Ю. Асанова [и др.]. – Текст : непосредственный // Журнал имени профессора Б.М. Костюченка. – 2016. – Т. 3, № 1. – С. 12-18.

82. Получение антибактериального комплекса на основе сукцинахитозана / В. Л. Лапенко, А. И. Сливкин, А. С. Беленова [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. Воронеж. – 2011. – № 2. – С. 195-198.

83. Попов, Н. Н. Разработка состава, технологии и норм качества пролонгированных глазных капель антимикробного действия : специальность 14.04.01 : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Попов Николай Николаевич. – Волгоград, 2015. – 148 с. – Текст : непосредственный.

84. Пятигорская, Н. В. Виды модификации хитозана путем использования различных дериватирующих агентов / Н. В. Пятигорская, В. С. Каргин, Г. Э. Бркич // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2021. – Т. 23. – № 4. – С. 23-30. – DOI 10.26787/nydha-2686-6838-2021-23-4-23-30.

85. Роль структуры в биологической активности хитозана / С. Н. Куликов, Ю. А. Тюрин, Д. А. Долбин, Р. З. Хайруллин. – Текст : непосредственный // Вестник Казанского технологического университета. – 2007. – № 6. – С. 11-16.

86. Рябченко, Н. И. Антиоксидантные и прооксидантные свойства аскорбиновой кислоты, дигидрохверцетина и мексидола в радикальных реакциях, индуцированных ионизирующим излучением и химическими реагентами / Н. И. Рябченко, В. И. Рябченко, Б. П. Иванник [и др.]. – Текст : непосредственный // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2010. – Т. 50, № 2. – С. 186-194.

87. Самохвалов, Ю. Я. Оценка эффективности научных и научно-технических проектов на основе обобщенной функции Харрингтона / Ю. Я. Самохвалов, О. И. Бурба. – Текст : непосредственный // Системи управління, навігації та зв'язку. – 2018. – № 4(50). – С. 77-85.

88. Седова, М. К. Разработка состава и методов контроля качества твердой лекарственной формы левофлоксацина : специальность 14.04.02, 14.04.01 : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Седова Мария Константиновна. – Москва, 2016. – 176 с. – Текст : непосредственный.

89. Серба, Е. М. Биотехнологические основы ресурсосберегающей переработки зернового сырья и вторичных биоресурсов : специальность 03.01.06 : диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Серба Елена Михайловна. – Щеково, 2015. – 362 с. – Текст : непосредственный.

90. Современные подходы фармакологической коррекции патологических рубцов / А. В. Воронков, Э. Ф. Степанова, Ю. Ю. Жидкова, О. Ю. Гамзелева. – Текст : непосредственный // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 3-2. – С. 301-308.
91. Хисямова, Д. М. Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода Лапчатка (*Potentilla L.*) : специальность 14.04.02 : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Хисямова Динара Мидхатована. – Самара, 2017. – 172 с. – Текст : непосредственный.
92. Хитин и хитозан : получение, свойства и применение / под редакцией К. Г. Скрябина, Г. А. Вихоревой, В. П. Варламова. – Текст : непосредственный. – Москва : Наука ; Интерпериодика. 2002. – 365 с. – Текст : электронный
93. Хитозан для фармации и медицины / Д. А. Сливкин, В. Л. Лапенко, О. А. Сафонова [и др.]. – Текст : непосредственный // *Вестник Воронежского государственного университета*. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2011. – № 2. – С. 214-232.
94. Хитозансодержащие композиты протеиназ / Е. Е. Савельева, Э. Э. Досадина, Л. Л. Бркич [и др.]. – Текст : непосредственный // *Химическая промышленность сегодня*. – 2017. – № 7. – С. 32-42.
95. Хруцкий, Р. В. Разработка финансовых стратегий компаний США / Р. В. Хруцкий. – Текст : электронный // *США & Канада: экономика – политика – культура*. – 2013. – № 2 (518). – С. 103-118. – URL: <https://usacanada.jes.su/s268667300000617-8-1-ru-117/> (дата обращения : 10.03.2020). – Режим доступа: свободный.
96. Экспериментальное обоснование применения геля на основе ацетата хитозана для лечения ожогов / М. В. Погорелов, О. В. Калинин, Т. В. Ивахнюк [и др.]. – Текст : непосредственный // *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*. – 2012. – № 4. – С. 35-46.
97. Экспериментальное обоснование сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного облучения при хирургическом лечении инфицированных ожоговых ран кожи / В. В. Алипов, П. А. Беляев, А. И. Урусова, Е. А. Добрейкин. – Текст : непосредственный // *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. – 2013. – Т. VI, № 4. – С. 411-417.
98. Энде, Д. Производство лекарственных средств. Химическая технология от R&D до производства / Д. Энде, В. В. Береговых. – Санкт-Петербург : Профессия, 2015. – 1280 с. – Текст : электронный. – URL: <https://znanium.com/catalog/product/535785> (дата обращения: 16.03.2021). – Режим доступа: по подписке.

99. Яхкинд, М. И. Наносистемы для интраназальной доставки лекарств / М. И. Яхкинд, К. Р. Таранцева. – Текст : непосредственный // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского. – 2012. – № 29. – С. 284-292.
100. 5-Fluorouracil monodispersed chitosan microspheres : Microfluidic chip fabrication with crosslinking, characterization, drug release and anticancer activity / T. He, W. Wang, B. Chen [et al.] // Carbohydrate polymers. – 2020. – Vol. 236. – P. 116094.
101. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery / S.C. Chen, Y.-C. Wu, F.-L. Mi [et al.] // Journal Control. Release. – 2004. – Vol. 96, N 2. – P. 285-300.
102. A randomized, clinical trial to evaluate efficacy and tolerability of trypsin:chymotrypsin as compared to serratiopeptidase and trypsin: bromelain : rutoside in wound management / A. Chandanwale, D. Langade, D. Sonawane, P. Gavai // Advances in therapy. – 2017. – Vol. 34, N 1. – P.180-198.
103. Agnihotri, S. Antimicrobial chitosan–PVA hydrogel as a nanoreactor and immobilizing matrix for silver nanoparticles / S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji // Application of Nanoscience. – 2012. – Vol. 2, N 3. – P. 179-188.
104. Antibiotic-loaded chitosan-gelatin scaffolds for infected seawater immersion wound healing / Q. Fang, Z. Yao, L. Feng [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – N 159. – P. 1140-1155.
105. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides / W. Xia, P. Liuc, J. Zhangad, J. Chen // Food Hydrocolloids. – 2011. – Vol. 25, N 2. – P. 170-179.
106. Birk, S. E. Microcontainer delivery of antibiotic improves treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / S. E. Birk, J. A. J. Haagenzen, H. K. Johansen [et al.] //Advanced Healthcare Materials. – 2020. – Vol. 9, N 10. – P. 1901779.
107. Brakenbury, P. H. A comparative study of the management of ankle sprain / P. H. Brakenbury, J. Kotowski // British Journal of Clinical Practice. – 1984. – Vol. 37, N 5. – P. 181-184.
108. Brkich, L.L. Development of a Scientific Methodological Approach to Expansion of Product Range for Treatment of Infected Wounds / L.L. Brkich // Asian Journal of Pharmaceutics. – 2017. – Vol. 11, N 4. – P. 739-744.
109. Chandra, R. Biodegradable polymers / R. Chandra, R. Rustgi // Progress in Polymer Science. – 1998. – N 23. – P. 1273-1335.
110. Chemical and physical chitosan hydrogels as prospective carriers for drug delivery : a review / B. Tian, S. Hua, T. Liu, J. Liu. – Text : electronic // The Royal Society of Chemistry. – 2020. – Vol. 8, N 44. – P. 10050-10064. – DOI: 10.1039/d0tb01869d.

111. Chen, L. Synthesis and pH sensitivity of carboxymethyl chitosan-based polyampholyte hydrogels for protein carrier matrices / L. Chen, Z. Tian, Y. Du // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25, N 17. – P. 3725-3732.
112. Cheng, L. Preparation and Controlled Release of Imidacloprid/Carboxymethyl-chitosan Gel Beads / L. Cheng, J. Zhao // *Fine Chemicals-Dalian*. – 2005. – Vol. 22, N 9. – P. 653-657.
113. Chitosan Derivatives as Bile Acid and Cholesterol Sorbents / J. Tuma, M. Marounek, D. Dušková [et al.] // *Journal of Chitin and Chitosan Science*. – 2011. – Vol. 16, N 4. – P. 262-270.
114. Chitosan from *Absidia coerulea* / R.A.A. Muzzarelli, P. Hiari, R. Tarsi, B. Dibini [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 1994. – Vol. 25, N 1. – P. 45-50.
115. Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan / R. Ylitalo, S. Lehtinen, E. Wuolijoki [et al.]. – Text : electronic // *Arzneimittelforschung*. – 2002. – Vol. 52, N 1. – P. 1-7. – DOI: 10.1055/s-0031-1299848.
116. Croisier, F. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering / F. Croisier, C. Jérôme // *European Polymer Journal*. – 2013. – N 49. – P. 780-792.
117. Degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan and its potential application for peripheral nerve regeneration / G. Lu, L. Kong, B. Sheng [et al.] // *European Polymer Journal*. – 2007. – Vol. 43, N 9. – P. 3807-3818.
118. Dual-crosslinked nanocomposite hydrogels based on quaternized chitosan and clindamycin-loaded hyperbranched nanoparticles for potential antibacterial applications / S. Wei, X. Liu, J. Zhou // *International journal of biological macromolecules*. – 2020. – Vol. 155. – P. 153-162.
119. Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold / T. Ikeda, K. Ikeda, K. Yamamoto, H. Ishizaki. – Text : electronic // *BioMed Research International*. – 2014. – Vol.51, N 10. – DOI:10.1155/2014/786892.
120. Gelse, K. Collagens – structure, function and biosynthesis / K. Gelse, E. Poschi, T. Aigner // *Advanced drug delivery reviews*. – 2003. – Vol. 55, N 12. – P. 1531-1546.
121. Goel, V.K. The use of Chymoral tablets in accident and casualty departments / V. K. Goel, B. Sengupta // *British Journal of Sports Medicine*. – 1973. – Vol. 7, N 1-2. – P.67-69.
122. Haas, D. A. An update on local anesthetics in dentistry / D. A. Haas. – Text : electronic // *Journal-Canadian Dental Association*. – 2002. – Vol. 68, N 9. – P. 546-552.
123. Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms / B. A. Buhren, H. Schruppf, N.-P. Hoff [et al.]. – Text : electronic // *European journal of medical research*. 2016. – Vol. 21, N 5. – DOI 10.1186/s40001-016-0201-5.
124. Immobilization of collagen onto polymer surfaces having hydroxyl groups / Y. Tabata, S. V. Lonikar, F. Horii, Y. Ikada // *Biomaterials*. – 1986. – Vol. 7, N 3. – P. 234-238.

125. In vitro comparative hemostatic studies of chitin, chitosan, and their derivatives / W. Janvikul, P. Uppanan, B. Thavorniyutikarn [et al.] // *Journal of applied polymer science*. – 2006. – Vol. 102, N. 1. – P. 445-451.
126. Kumar, S. P. Local hemostatic agents in the management of bleeding in oral surgery / S. P. Kumar // *Asian Journal Pharmaceutical and Medical Research*. – 2016. – Vol. 9, N 3. – P. 35-41.
127. Lipid peroxidation: Mechanism, models and significance / N. Wadhwa, B. B. Mathew, S. K. Jatawa, A. Tiwari [et al.] // *International journal of current science*. – 2012. – N 3. – P. 11-17.
128. Multifunctional layer-by-layer modified chitosan/poly (ethylene glycol) hydrogels / B. Onat, S. Ulasan, S. Banerjee, I. Erel-Goktepe // *European Polymer Journal*. – 2019. – Vol. 112. – P. 73-86.
129. Nair, L. S. Biodegradable polymers as biomaterials / L. S. Nair, C. T. Laurencin // *Progress in polymer science*. – 2007. – Vol. 32, N 9. – P. 762-798.
130. Nanohybrid hydrogels designed for transbuccal anesthesia / L. N. De Moraes Ribeiro, M. Franz-Montan, M. C. Breitzkreitz // *International Journal of Nanomedicine*. – 2018. – Vol. 13. – P. 6453-6463.
131. O-Carboxymethylchitosan-based novel gatifloxacin delivery system / Y. Lanhua, Z. Aiping, Z. Qian-qian [et al.] // *Journal of Yangzhou University*. – 2008. – Vol. 11, N 4. – P. 36-40.
132. Pastor de Abram, A. Quitina y Quitosano : obtención, caracterización y aplicaciones / A. Pastor de Abram, I. Higuera // *Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Resultados del proyecto CYTED IV*. – 2004. – Vol. 14.
133. Pawar, V. Cefuroxime conjugated chitosan hydrogel for treatment of wound infections / V. Pawar, M. Dhanka, R. Srivastava // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2019. – N 173. – P. 776-787.
134. *Pharmaceutical Statistics Drugs and the pharmaceutical sciences* / J. Swarbrick (ed.). – New-York : Informa healthcare, 2010. – 672 p.
135. Physicochemical properties of intravitreal implant based on chitosan/polyvinyl alcohol saturated with 5-fluorouracil / A. O. Baiyrkhanova, T. K. Botabekova, Y. M. Semenova [et al.]. – Text : electronic // *Sovremennye tehnologii v medicine*. – 2017. – Vol. 9, N (3). – P. 102-109. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/physicochemical-properties-of-intravitreal-implant-based-on-chitosan-polyvinyl-alcohol-saturated-with-5-fluorouracil> (дата обращения: 16.02.2021).
136. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques / N. Lucas, C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec [et al.] // *Chemosphere*. – 2008. – Vol. 73, N 4. – P. 429-442.
137. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods / M.-H. Ho, P.-Y. H.-J. Kuo, T.-Y. Hsieh // *Biomaterials*. – 2004. – N 25. – P. 129-138.

138. Qin, W. Hydration and Moisturizing Properties of N-Succinylcholine / W. Qin, W. Li, W. Ai-Gin // *Riyong huaxue gongye*. – 2005. – Vol. 35, N 4. – P. 223-226.
139. Seki, Y. Synthesis of pH dependent chitosan-EPI hydrogel films and their application for in vitro release of promethazine hydrochloride / Y. Seki, K. Yurdakos. – Text : electronic // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2008. – Vol. 109, N 1. – P. 683-690. – DOI:10.1002/app.28127.
140. Shah, D. The Role of Trypsin : Chymotrypsin in Tissue Repair / D. Shah, K. Mital. – Text : electronic // *Advances in Therapy*. – 2018. – Vol.35, N 1. – DOI : 10.1007/s12325-017-0648-y.
141. Suzuki, S. 20- local anesthetics / S. Suzuki, P. B. Gerner, P. Lirk // *Pharmacology and physiology for anesthesia*. – 2nd ed. – Philadelphia : Elsevier, 2019. – P. 390-411.
142. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles / A. Anitha, V. V. D. Rani, K. Radhakrishnan [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2009. – Vol. 78, N 4. – P. 672-677.
143. Szmola, R. Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin : Identity with Rinderknecht's enzyme Y / R. Szmola, M. Sahin-Toth. – Text : electronic // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104, N 27. – P. 11227-11232. – URL: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0703714104 (дата обращения: 16.02.2021).
144. The Effect of a Nanostructured Chitosan–Bee Venom–Gold Nanoparticle System on Free Radical Process Activity, Blood System Adaptation, and Tumor Growth in Rats with Transplanted Cancer PC-1 / V. N. Dydykina, J. D. Zotova, A. E. Mochalova [et al.]. – Text : electronic // *Современные технологии в медицине*. –2015. – Vol. 7, N 2. – P. 41-46. – DOI : 10.17691/stm2015.7.2.05.
145. The synthesis of carboxymethylchitosan hydrogel and the application in drug controlled release systems / L. Sun, Y. Du, L. Chen [et al.] // *Acta Polymerica Sinica*. – 2004. – N. 2. – P. 191-195.
146. Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications, *Advances in Experimental Medicine and Biology* / Labrou N. (ed.). – Text : electronic. – Singapore : Springer Nature Pte Ltd, 2019. – DOI : 10.1007/978-981-13-7709-9_1.
147. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell delivery vehicle / C. D. Hoemann, J. Sun, A. Légaré [et al.] // *Osteoarthritis Cartil.* – 2005. – Vol. 13, N 4. – P. 318-329.
148. Vroman, I. Biodegradable Polymers / I. Vroman, L. Tighzert. – Text : electronic // *Materials*. – 2009. – Vol.2, N 2. – P. 307-344. – DOI: 10.3390/ma2020307.
149. White, M. J. V. Trypsin potentiates human fibrocyte differentiation / M. J V. White, M. Glenn, R. H. Gomer. – Text : electronic // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, N 8. – P. 70795. – DOI: 10.1371/journal.pone.0070795.

150. Zhao, S. Electrospinning of ethyl–cyanoethyl cellulose/tetrahydrofuran solutions / S. Zhao, X. Wu, L. Wang, Y. Huang // Journal of Applied Polymer Science. – 2004. – Vol. 91, N. 1. – P. 242-246.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Результаты исследования высвобождения протеолитического фермента из протокола анализа теста растворимости

Таблица А.1 – Результаты исследования высвобождения образцов препарата сравнения

№	Химопсин, лиофилизат 10 мг. Серия 741220. Изготовлено: ООО «Самсон-Мед» Среда: Казеинат натрия pH=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	47,10	78,99	90,04	97,28	99,63	99,67	99,47	99,64	99,56	99,54	99,74	99,34
2	46,87	78,82	89,92	97,16	99,70	99,54	99,69	99,74	99,64	99,74	99,67	99,41
3	46,91	79,17	90,31	97,22	99,73	99,48	99,53	99,76	99,71	99,60	99,76	99,45
4	47,11	78,89	90,24	97,24	99,63	99,59	99,75	99,83	99,74	99,84	99,60	99,32
5	46,90	79,00	90,16	97,29	99,36	99,53	99,75	99,64	99,65	99,46	99,68	99,65
6	47,00	78,92	89,99	97,12	99,59	99,69	99,53	99,56	99,76	99,67	99,51	99,61
7	46,99	79,05	90,15	97,26	99,50	99,64	99,55	99,72	99,71	99,76	99,41	99,46
8	46,91	79,07	90,13	97,09	99,37	99,49	99,66	99,66	99,71	99,56	99,65	99,56
9	47,08	79,06	90,01	97,20	99,61	99,58	99,70	99,85	99,79	99,60	99,52	99,66
10	47,16	78,98	90,16	97,15	99,59	99,63	99,58	99,62	99,76	99,81	99,73	99,34
11	47,04	79,15	90,02	97,03	99,45	99,69	99,47	99,73	99,62	99,43	99,53	99,54
12	46,86	78,89	89,96	97,13	99,69	99,51	99,83	99,78	99,62	99,47	99,77	99,34
Метрологические измерения												
Q	46,99	79,00	90,09	97,18	99,57	99,59	99,63	99,71	99,69	99,62	99,63	99,47
S ² x	1,10 × 10 ⁻²	1,14 × 10 ⁻²	1,45 × 10 ⁻²	6,60 × 10 ⁻³	1,56 × 10 ⁻²	6,03 × 10 ⁻³	1,41 × 10 ⁻²	7,95 × 10 ⁻³	5,00 × 10 ⁻³	1,99 × 10 ⁻²	1,40 × 10 ⁻²	1,58 × 10 ⁻²
CO	0,1050	0,1067	0,1202	0,0812	0,1249	0,0776	0,1186	0,0892	0,0707	0,1411	0,1181	0,1257
RSD	0,22	0,14	0,13	0,08	0,13	0,08	0,12	0,09	0,07	0,14	0,12	0,13

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица А.2 – Результаты исследования высвобождения образца состава лекарственного средства №1

№	Образец состава лекарственного средства №1, порошок 131 мг. Серия № 11506											
	Среда: Казеинат натрия pH=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	33,06	61,07	72,98	90,70	95,83	95,90	95,72	95,77	96,01	95,87	96,16	96,20
2	33,33	61,33	73,16	90,77	95,55	95,72	95,91	95,90	95,95	95,92	96,01	95,94
3	33,17	61,11	73,10	90,61	95,92	95,77	96,00	95,88	95,80	96,15	96,19	96,07
4	33,31	61,18	73,19	90,66	95,88	95,95	95,95	96,01	95,83	96,00	95,90	96,03
5	33,02	61,03	73,13	90,57	95,73	95,86	95,85	96,07	96,02	95,93	96,07	96,14
6	33,05	61,11	73,22	90,68	95,73	95,82	96,06	95,80	95,86	95,78	95,87	95,95
7	33,29	61,39	73,15	90,62	95,57	95,83	95,71	95,90	95,78	95,96	96,01	95,97
8	33,22	61,02	73,26	90,58	95,75	95,94	95,81	95,94	95,78	96,12	96,25	95,97
9	33,32	61,13	73,21	90,63	95,77	95,88	96,09	95,85	95,97	95,75	96,22	96,05
10	33,11	61,19	72,99	90,52	95,59	95,78	95,77	95,95	95,79	96,08	96,18	96,28
11	33,09	61,38	73,08	90,67	95,79	95,87	96,01	95,99	95,88	95,88	96,03	96,21
12	33,00	61,24	73,06	90,62	95,91	95,92	95,96	96,04	95,94	95,95	95,92	96,02
Метрологические измерения												
Q	33,16	61,18	73,13	90,64	95,75	95,85	95,90	95,93	95,88	95,95	96,07	96,07
S ² _x	1,57×10 ⁻²	1,71×10 ⁻²	7,80×10 ⁻³	4,36×10 ⁻³	1,64×10 ⁻²	5,27×10 ⁻³	1,70×10 ⁻²	8,53×10 ⁻³	7,95×10 ⁻³	1,54×10 ⁻²	1,69×10 ⁻²	1,30×10 ⁻²
CO	0,1252	0,1307	0,0883	0,0661	0,1282	0,0726	0,1305	0,0924	0,0892	0,1240	0,1299	0,1138
RSD	0,38	0,21	0,12	0,07	0,13	0,08	0,14	0,10	0,09	0,13	0,14	0,12

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица А.3 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №2

№	Образец состава лекарственного средства №2, порошок 131 мг мг. Серия № 21706											
	Среда: Казеинат натрия рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	34,84	64,46	75,35	92,12	96,17	96,35	96,67	96,68	96,83	96,81	97,28	97,17
2	34,92	64,50	75,20	92,18	96,53	96,47	96,48	96,70	96,68	96,66	96,98	97,03
3	35,05	64,23	75,08	92,17	96,33	96,48	96,39	96,51	96,86	97,08	96,93	97,27
4	34,76	64,53	75,42	92,24	96,48	96,42	96,59	96,72	96,67	96,73	97,15	97,24
5	35,10	64,48	75,04	92,13	96,39	96,43	96,37	96,65	96,82	96,87	97,04	97,07
6	35,02	64,57	75,24	92,26	96,28	96,50	96,55	96,69	96,66	96,78	97,09	96,99
7	34,85	64,22	75,05	92,18	96,29	96,39	96,34	96,56	96,76	97,12	96,90	97,11
8	35,14	64,46	75,29	92,05	96,41	96,42	96,38	96,71	96,85	96,86	97,20	97,19
9	34,99	64,29	75,23	92,07	96,44	96,56	96,68	96,66	96,83	96,70	97,00	96,97
10	34,94	64,45	75,36	92,12	96,29	96,45	96,58	96,56	96,86	97,01	97,14	97,04
11	34,91	64,22	75,30	92,09	96,26	96,41	96,43	96,60	96,65	96,87	97,06	97,21
12	34,87	64,37	75,15	92,04	96,31	96,33	96,52	96,52	96,75	97,01	97,21	97,03
Метрологические измерения												
Q	34,95	64,40	75,23	92,14	96,35	96,44	96,50	96,63	96,77	96,87	97,08	97,11
S ² _x	1,30×10 ⁻²	1,70×10 ⁻²	1,57×10 ⁻²	4,77×10 ⁻³	1,06×10 ⁻²	4,05×10 ⁻³	1,39×10 ⁻²	5,80×10 ⁻³	7,28×10 ⁻³	2,27×10 ⁻²	1,40×10 ⁻²	1,05×10 ⁻²
CO	0,1142	0,1304	0,1255	0,0691	0,1030	0,0636	0,1179	0,0761	0,0853	0,1507	0,1182	0,1024
RSD	0,33	0,20	0,17	0,07	0,11	0,07	0,12	0,08	0,09	0,16	0,12	0,11

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица А.4 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №3

№	Образец состава лекарственного средства №3, порошок 131 мг мг. Серия № 32106											
	Среда: Казеинат натрия рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	38,41	68,44	88,11	95,32	97,47	97,49	97,88	97,82	98,10	98,04	98,48	98,75
2	38,71	68,42	88,31	95,47	97,33	97,66	97,73	97,67	98,07	98,22	98,71	98,78
3	38,67	68,32	88,42	95,41	97,60	97,58	97,79	97,85	98,05	98,43	98,41	98,87
4	38,60	68,22	88,33	95,49	97,57	97,74	97,85	97,92	97,89	98,36	98,75	98,87
5	38,65	68,38	88,40	95,39	97,41	97,66	97,79	97,94	98,08	98,09	98,74	98,74
6	38,37	68,16	88,45	95,36	97,67	97,50	97,76	97,86	97,91	98,40	98,63	98,90
7	38,53	68,31	88,08	95,27	97,54	97,62	97,69	97,93	98,05	98,38	98,62	98,71
8	38,74	68,41	88,13	95,28	97,60	97,72	97,60	97,71	97,92	98,46	98,47	98,83
9	38,37	68,23	88,29	95,40	97,46	97,69	97,83	97,66	98,03	98,05	98,40	98,79
10	38,73	68,25	88,15	95,46	97,35	97,57	97,58	97,79	98,08	98,29	98,54	98,66
11	38,61	68,40	88,21	95,38	97,38	97,68	97,89	97,97	97,99	98,17	98,38	98,70
12	38,43	68,44	88,35	95,24	97,36	97,53	97,92	97,93	97,91	98,34	98,66	98,83
Метрологические измерения												
Q	38,57	68,33	88,27	95,37	97,48	97,62	97,78	97,84	98,01	98,27	98,57	98,79
S ² x	1,98×10 ⁻²	9,76×10 ⁻³	1,66×10 ⁻²	6,89×10 ⁻³	1,31×10 ⁻²	7,11×10 ⁻³	1,19×10 ⁻²	1,21×10 ⁻²	6,30×10 ⁻³	2,27×10 ⁻²	1,88×10 ⁻²	5,74×10 ⁻³
CO	0,1407	0,0988	0,1289	0,0830	0,1145	0,0843	0,1090	0,1098	0,0794	0,1507	0,1371	0,0758
RSD	0,36	0,14	0,15	0,09	0,12	0,09	0,11	0,11	0,08	0,15	0,14	0,08

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица А.5 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №4

№	Образец состава лекарственного средства №4, порошок 131 мг мг. Серия № 42306											
	Среда: Казеинат натрия рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	38,21	66,95	78,62	93,85	96,69	97,08	96,93	97,19	97,42	97,65	97,64	97,71
2	38,38	66,87	78,73	94,08	96,80	97,05	97,24	97,25	97,45	97,44	97,85	97,68
3	38,28	67,04	78,55	93,99	96,74	96,94	97,03	97,33	97,50	97,71	97,74	97,84
4	38,36	66,93	78,65	93,91	96,97	96,93	96,96	97,28	97,35	97,48	97,90	97,97
5	38,45	66,74	78,50	94,10	96,69	97,09	97,09	97,18	97,44	97,79	97,61	97,72
6	38,39	66,75	78,81	94,04	96,74	96,89	97,01	97,22	97,36	97,55	97,83	97,66
7	38,32	67,11	78,52	93,94	96,97	97,08	96,94	97,15	97,56	97,52	97,90	97,91
8	38,48	66,94	78,64	93,98	96,91	97,05	97,12	97,23	97,51	97,77	97,57	97,87
9	38,28	66,86	78,83	93,97	96,78	96,87	97,19	97,38	97,41	97,51	97,75	97,87
10	38,22	66,77	78,59	94,04	96,86	96,95	97,23	97,25	97,61	97,61	97,63	97,64
11	38,19	66,93	78,66	94,08	96,77	96,92	97,25	97,34	97,58	97,51	97,80	97,95
12	38,41	67,09	78,67	94,06	97,05	96,85	96,95	97,12	97,46	97,68	97,86	97,78
Метрологические измерения												
Q	38,33	66,92	78,65	94,00	96,83	96,97	97,08	97,24	97,47	97,60	97,75	97,80
S ² x	9,26×10 ⁻³	1,61×10 ⁻²	1,11×10 ⁻²	5,74×10 ⁻³	1,40×10 ⁻²	8,12×10 ⁻³	1,57×10 ⁻²	6,11×10 ⁻³	6,78×10 ⁻³	1,38×10 ⁻²	1,44×10 ⁻²	1,32×10 ⁻²
CO	0,0962	0,1268	0,1052	0,0757	0,1182	0,0901	0,1251	0,0782	0,0824	0,1173	0,1198	0,1149
RSD	0,25	0,19	0,13	0,08	0,12	0,09	0,13	0,08	0,08	0,12	0,12	0,12

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица А.6 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №5

№	Образец состава лекарственного средства №5, порошок 136 мг мг. Серия № 52806											
	Среда: Казеинат натрия рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	31,38	54,73	69,40	88,26	94,74	94,76	94,90	94,92	95,01	95,22	95,22	95,35
2	31,57	54,64	69,52	88,21	94,48	94,73	94,71	94,98	95,09	95,32	95,57	95,30
3	31,30	54,56	69,38	88,28	94,80	94,63	94,81	95,08	95,10	95,42	95,32	95,40
4	31,62	54,48	69,77	88,07	94,69	94,77	94,86	94,94	95,03	95,37	95,35	95,35
5	31,59	54,50	69,64	88,25	94,74	94,66	94,82	95,06	95,17	95,45	95,33	95,51
6	31,51	54,81	69,53	88,11	94,49	94,75	94,74	94,88	94,96	95,34	95,50	95,36
7	31,40	54,83	69,40	88,16	94,72	94,68	94,79	95,09	95,20	95,02	95,43	95,27
8	31,65	54,53	69,39	88,22	94,60	94,63	95,01	95,04	95,00	95,37	95,32	95,32
9	31,68	54,69	69,68	88,13	94,75	94,81	94,79	95,09	95,13	95,05	95,23	95,56
10	31,44	54,80	69,54	88,17	94,81	94,85	94,71	94,99	95,09	95,45	95,30	95,38
11	31,54	54,67	69,47	88,07	94,55	94,61	94,70	95,10	95,12	95,24	95,27	95,54
12	31,36	54,56	69,76	88,10	94,76	94,70	94,93	95,13	95,11	95,35	95,50	95,51
Метрологические измерения												
Q	31,50	54,65	69,54	88,17	94,68	94,71	94,81	95,03	95,08	95,30	95,36	95,40
S ² x	1,53×10 ⁻²	1,52×10 ⁻²	2,02×10 ⁻²	5,61×10 ⁻³	1,37×10 ⁻²	5,81×10 ⁻³	9,36×10 ⁻³	6,46×10 ⁻³	5,17×10 ⁻³	2,04×10 ⁻²	1,27×10 ⁻²	9,80×10 ⁻³
CO	0,1236	0,1232	0,1421	0,0749	0,1169	0,0762	0,0968	0,0804	0,0719	0,1428	0,1128	0,0990
RSD	0,39	0,23	0,20	0,08	0,12	0,08	0,10	0,08	0,08	0,15	0,12	0,10

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица А.7 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №6

№	Образец состава лекарственного средства №6, порошок 136 мг мг. Серия № 63006											
	Среда: Казеинат натрия рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	32,96	60,25	72,15	90,44	95,40	95,42	95,61	95,81	95,80	96,12	96,04	96,11
2	32,96	60,35	72,05	90,49	95,27	95,37	95,69	95,89	95,92	95,83	96,10	96,20
3	33,13	60,49	72,11	90,63	95,48	95,53	95,77	95,76	96,00	96,00	96,15	96,41
4	32,90	60,19	72,03	90,58	95,50	95,54	95,64	95,70	95,77	96,05	96,25	96,13
5	32,77	60,24	72,21	90,53	95,19	95,58	95,59	95,65	95,81	95,89	96,03	96,42
6	32,97	60,18	72,16	90,43	95,43	95,51	95,48	95,82	95,83	96,19	96,32	96,39
7	32,83	60,35	72,25	90,64	95,35	95,47	95,53	95,61	95,99	96,09	96,21	96,22
8	33,02	60,54	72,01	90,57	95,18	95,41	95,78	95,86	95,95	96,04	96,02	96,16
9	33,12	60,30	72,09	90,45	95,48	95,34	95,58	95,70	95,76	95,96	96,06	96,43
10	32,84	60,51	72,32	90,55	95,34	95,43	95,63	95,73	95,97	96,13	96,34	96,34
11	32,92	60,38	72,32	90,54	95,17	95,45	95,54	95,87	95,91	95,84	96,26	96,40
12	33,09	60,29	72,35	90,69	95,47	95,39	95,47	95,81	95,81	96,05	96,32	96,43
Метрологические измерения												
Q	32,96	60,34	72,17	90,55	95,36	95,45	95,61	95,77	95,88	96,01	96,17	96,30
S ² x	1,31×10 ⁻²	1,49×10 ⁻²	1,40×10 ⁻²	6,88×10 ⁻³	1,59×10 ⁻²	5,64×10 ⁻³	1,04×10 ⁻²	8,00×10 ⁻³	7,70×10 ⁻³	1,33×10 ⁻²	1,50×10 ⁻²	1,67×10 ⁻²
CO	0,1144	0,1219	0,1185	0,0830	0,1260	0,0751	0,1017	0,0894	0,0878	0,1153	0,1224	0,1292
RSD	0,35	0,20	0,16	0,09	0,13	0,08	0,11	0,09	0,09	0,12	0,13	0,13

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица А.8 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №7

№	Образец состава лекарственного средства №7, порошок 136 мг. Серия № 70507											
	Среда: Казеинат натрия рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	34,86	62,30	73,28	93,70	96,68	96,90	97,02	97,47	97,47	97,74	97,99	97,90
2	34,90	62,41	73,10	93,75	96,75	96,92	97,32	97,20	97,60	97,69	97,85	98,19
3	34,81	62,33	72,93	93,71	96,66	96,97	97,12	97,32	97,37	97,72	97,74	98,08
4	35,02	62,65	72,99	93,61	96,72	96,83	97,35	97,37	97,50	97,47	97,96	98,10
5	35,13	62,43	73,20	93,77	96,82	96,97	97,08	97,38	97,54	97,61	98,00	97,99
6	35,08	62,56	73,24	93,63	96,61	96,82	97,21	97,29	97,39	97,57	97,79	98,09
7	34,82	62,55	72,98	93,79	96,72	96,85	97,03	97,39	97,49	97,80	97,72	98,00
8	35,06	62,52	73,28	93,69	96,83	96,99	97,31	97,45	97,43	97,63	97,86	97,89
9	34,83	62,27	72,99	93,83	96,75	96,94	97,10	97,35	97,53	97,78	97,69	98,21
10	34,87	62,40	73,13	93,84	96,93	97,07	97,09	97,32	97,45	97,88	98,01	98,06
11	34,93	62,52	73,04	93,79	96,64	96,87	96,98	97,48	97,36	97,59	97,91	98,05
12	34,80	62,47	73,17	93,64	96,81	97,08	97,23	97,31	97,61	97,49	97,83	98,11
Метрологические измерения												
Q	34,93	62,45	73,11	93,73	96,74	96,93	97,15	97,36	97,48	97,66	97,86	98,06
S ² _x	1,38×10 ⁻²	1,31×10 ⁻²	1,56×10 ⁻²	6,10×10 ⁻³	8,88×10 ⁻³	7,29×10 ⁻³	1,64×10 ⁻²	6,47×10 ⁻³	6,58×10 ⁻³	1,60×10 ⁻²	1,21×10 ⁻²	9,53×10 ⁻³
CO	0,1174	0,1146	0,1250	0,0781	0,0943	0,0854	0,1282	0,0805	0,0811	0,1265	0,1101	0,0976
RSD	0,34	0,18	0,17	0,08	0,10	0,09	0,13	0,08	0,08	0,13	0,11	0,10

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица А.9 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №8

№	Образец состава лекарственного средства №8, порошок 136 мг. Серия № 80707											
	Среда: Казеинат натрия рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	33,67	61,44	72,82	91,50	95,94	96,16	96,11	96,46	96,57	96,44	96,63	96,86
2	33,79	61,25	72,55	91,55	95,73	96,13	96,25	96,28	96,37	96,66	96,56	96,63
3	33,91	61,30	72,65	91,54	96,00	96,04	96,15	96,22	96,36	96,49	96,78	96,60
4	33,91	61,28	72,49	91,62	95,81	96,08	96,13	96,33	96,61	96,71	96,49	96,57
5	33,57	61,50	72,80	91,64	95,84	96,20	96,23	96,27	96,39	96,57	96,44	96,71
6	33,88	61,23	72,54	91,48	95,82	96,13	96,35	96,50	96,52	96,75	96,42	96,65
7	33,82	61,27	72,60	91,43	96,09	96,27	96,06	96,44	96,60	96,48	96,51	96,82
8	33,61	61,17	72,71	91,61	95,79	96,15	96,08	96,37	96,40	96,36	96,68	96,52
9	33,58	61,18	72,66	91,47	96,01	96,07	96,27	96,24	96,43	96,34	96,57	96,83
10	33,84	61,51	72,84	91,66	95,87	96,18	96,40	96,40	96,43	96,49	96,79	96,58
11	33,52	61,47	72,64	91,48	96,08	96,06	96,19	96,30	96,48	96,52	96,41	96,58
12	33,66	61,19	72,69	91,53	95,99	96,06	96,34	96,35	96,49	96,34	96,69	96,66
Метрологические измерения												
Q	33,73	61,32	72,67	91,54	95,92	96,13	96,21	96,35	96,47	96,51	96,58	96,67
S ² x	2,03×10 ⁻²	1,64×10 ⁻²	1,25×10 ⁻²	5,88×10 ⁻³	1,38×10 ⁻²	4,72×10 ⁻³	1,24×10 ⁻²	8,12×10 ⁻³	7,62×10 ⁻³	1,93×10 ⁻²	1,76×10 ⁻²	1,27×10 ⁻²
CO	0,1424	0,1280	0,1118	0,0767	0,1176	0,0687	0,1115	0,0901	0,0873	0,1389	0,1328	0,1125
RSD	0,42	0,21	0,15	0,08	0,12	0,07	0,12	0,09	0,09	0,14	0,14	0,12

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Результаты исследования высвобождения амилолитического фермента из протокола анализа теста растворимости

Таблица Б.1 – Результаты исследования высвобождения образцов препарата сравнения

№	Лидаза, лиофилизат 10 мг. Серия № 841119. Среда: Казеинат натрия/Крахмал (1:1) рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	75,00	90,16	87,43	98,91	100,55	108,74	91,53	106,56	89,62	106,28	92,62	96,17
2	72,50	88,52	92,90	97,81	95,08	91,26	103,83	105,74	99,45	89,89	108,74	97,54
3	67,50	73,77	96,72	101,64	97,81	95,36	110,38	101,37	90,44	101,09	106,28	107,38
4	57,50	78,69	91,26	89,07	98,91	101,09	104,92	97,54	103,55	109,84	106,28	93,17
5	74,17	90,16	91,80	96,17	110,38	101,37	101,37	90,44	93,44	89,62	104,92	100,00
6	62,50	77,05	96,17	99,45	100,00	109,56	88,52	100,82	110,11	109,84	98,91	100,00
7	75,83	80,33	93,44	98,36	96,72	105,19	103,28	92,90	98,91	93,44	91,26	107,92
8	65,00	78,69	95,08	93,99	98,36	90,44	109,02	98,63	93,17	97,54	94,81	90,71
9	65,83	85,25	91,80	92,90	101,64	89,07	92,90	93,44	97,81	97,54	89,34	105,74
10	70,00	72,13	88,52	101,09	99,45	109,02	90,44	100,27	88,52	104,64	89,07	105,19
11	70,83	70,49	97,27	96,17	105,46	88,80	101,09	104,92	96,99	92,35	110,38	106,56
12	73,33	90,16	84,15	101,64	92,90	101,64	107,10	102,19	99,18	105,46	104,64	98,63
Метрологические измерения												
Q	69,17	81,28	92,21	97,27	99,77	99,29	100,36	99,57	96,77	99,80	99,77	100,75
S ² x	31,57	53,97	15,86	14,66	21,31	64,57	57,81	27,10	38,72	55,34	63,67	33,53
CO	5,62	7,35	3,98	3,83	4,62	8,04	7,60	5,21	6,22	7,44	7,98	5,79
RSD	8,12	9,04	4,32	3,94	4,63	8,09	7,58	5,23	6,43	7,45	8,00	5,75

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица Б.2 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №1

№	Образец состава лекарственного средства №1, порошок 131 мг. Серия № 11506											
	Среда: Казеинат натрия/Крахмал (1:1) рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	40,00	60,66	81,42	84,15	87,43	90,71	85,52	96,17	88,80	98,63	93,72	83,06
2	39,17	54,10	77,60	98,36	80,33	103,28	86,89	86,61	91,80	96,17	86,61	92,90
3	46,67	54,10	72,68	97,81	97,27	88,52	101,91	94,26	102,46	89,34	85,52	92,90
4	48,33	52,46	75,41	95,08	92,35	94,26	101,37	85,52	84,43	99,18	84,97	82,79
5	50,83	60,66	84,15	88,52	90,71	88,80	95,90	92,62	90,98	84,97	89,62	91,26
6	42,50	62,30	76,50	85,25	81,97	96,17	103,83	95,36	99,45	99,18	89,62	98,36
7	52,50	62,30	69,95	86,34	102,73	93,72	85,52	91,26	95,08	96,99	100,00	92,62
8	59,17	63,93	73,22	89,07	98,91	94,54	86,34	87,43	93,44	85,79	82,79	98,09
9	60,83	68,85	86,34	98,91	97,27	87,98	105,74	95,90	88,25	91,53	99,73	83,88
10	50,00	49,18	79,78	71,04	85,25	92,90	101,64	95,63	93,17	87,70	101,91	102,73
11	57,50	62,30	79,23	96,72	93,44	95,63	94,54	102,46	90,16	87,70	103,83	101,64
12	41,67	63,93	73,22	90,16	95,63	89,34	86,89	100,27	100,55	98,91	94,81	86,89
Метрологические измерения												
Q	49,10	59,56	77,46	90,12	91,94	92,99	94,67	93,62	93,21	93,01	92,76	92,26
S ² x	5,56×10 ¹	3,34×10 ¹	2,44×10 ¹	6,49×10 ¹	4,90×10 ¹	1,90×10 ¹	6,47×10 ¹	2,74×10 ¹	2,90×10 ¹	3,25×10 ¹	5,29×10 ¹	4,95×10 ¹
CO	7,4574	5,7784	4,9380	8,0563	6,9984	4,3550	8,0442	5,2327	5,3880	5,6973	7,2761	7,0341
RSD	15,19	9,70	6,37	8,94	7,61	4,68	8,50	5,59	5,78	6,13	7,84	7,62

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица Б.3 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №2

№	Образец состава лекарственного средства №2, порошок 131 мг мг. Серия № 21706											
	Среда: Казеинат натрия/Крахмал (1:1) рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	47,50	63,93	83,61	86,89	96,72	96,17	95,63	102,46	88,52	93,72	87,70	100,82
2	53,33	59,02	74,32	93,44	95,08	90,98	86,61	96,99	91,26	95,90	95,90	97,54
3	40,00	60,66	80,87	88,52	91,26	99,73	89,89	94,54	89,34	88,52	98,63	85,25
4	54,17	67,21	69,40	106,01	97,27	91,26	98,91	97,81	100,55	97,27	95,63	93,99
5	36,67	52,46	79,23	89,07	96,17	97,54	92,90	91,26	106,28	86,07	86,34	84,97
6	52,50	60,66	81,97	96,17	100,55	99,18	97,81	90,71	98,91	93,99	89,89	92,35
7	50,00	57,38	74,32	91,26	95,08	87,98	97,54	96,17	103,01	103,55	103,83	100,27
8	64,17	65,57	79,23	89,07	92,90	98,63	104,37	95,36	96,17	99,45	92,08	86,07
9	61,67	67,21	71,04	92,90	98,36	103,55	101,09	95,90	86,34	103,55	101,09	102,46
10	60,83	62,30	77,05	90,71	93,44	87,70	96,72	91,80	93,17	91,53	91,26	94,26
11	45,83	49,18	79,78	102,73	91,26	101,37	103,83	98,63	92,35	95,90	90,16	98,09
12	59,17	63,93	83,06	91,80	97,81	101,09	90,71	101,91	99,73	89,34	99,18	90,98
Метрологические измерения												
Q	52,15	60,79	77,82	93,21	95,49	96,27	96,33	96,13	95,47	94,90	94,31	93,92
S ² x	7,44×10 ¹	3,15×10 ¹	2,16×10 ¹	3,38×10 ¹	8,31	2,96×10 ¹	3,03×10 ¹	1,44×10 ¹	3,93×10 ¹	3,10×10 ¹	3,10×10 ¹	3,81×10 ¹
CO	8,6271	5,6121	4,6453	5,8133	2,8833	5,4363	5,5083	3,7946	6,2657	5,5695	5,5713	6,1759
RSD	16,54	9,23	5,97	6,24	3,02	5,65	5,72	3,95	6,56	5,87	5,91	6,58

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, ции, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица Б.4 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №3

№	Образец состава лекарственного средства №3, порошок 131 мг мг. Серия № 32106											
	Среда: Казеинат натрия/Крахмал (1:1) рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	50,83	60,66	79,23	98,36	93,44	98,91	106,28	104,10	103,28	97,54	90,44	96,99
2	57,50	62,30	77,60	104,37	96,17	97,81	96,72	90,44	96,99	99,18	92,08	98,91
3	50,00	65,57	69,95	103,28	98,91	88,52	91,26	98,63	87,16	96,99	91,26	90,16
4	61,67	65,57	82,51	83,61	96,72	105,19	95,36	96,17	111,20	88,52	103,55	101,37
5	61,67	50,82	71,04	93,99	99,45	105,74	108,20	101,37	106,01	95,36	99,18	98,63
6	59,17	57,38	87,43	84,15	97,27	93,17	93,99	104,64	100,27	98,36	94,54	93,72
7	55,00	63,93	87,98	104,37	89,62	101,91	100,55	103,01	92,35	92,90	103,28	87,43
8	53,33	65,57	89,62	101,64	100,55	98,09	93,17	90,44	105,46	106,56	97,81	104,10
9	59,17	60,66	88,52	91,80	104,37	98,63	101,64	95,63	96,45	105,19	99,45	87,70
10	62,50	67,21	98,36	91,80	95,08	96,72	101,37	100,00	89,34	99,18	92,90	107,38
11	51,67	68,85	86,34	99,45	90,71	100,55	95,08	96,72	101,37	92,35	102,73	90,98
12	55,83	75,41	83,06	102,73	106,01	93,99	96,45	101,91	95,36	102,46	96,99	102,19
Метрологические измерения												
Q	56,53	63,66	83,47	96,63	97,36	98,27	98,34	98,59	98,77	97,88	97,02	96,63
S ² x	1,95×10 ¹	3,75×10 ¹	6,55×10 ¹	5,60×10 ¹	2,43×10 ¹	2,41×10 ¹	2,79×10 ¹	2,35×10 ¹	5,15×10 ¹	2,76×10 ¹	2,27×10 ¹	4,37×10 ¹
CO	4,4215	6,1272	8,0921	7,4847	4,9309	4,9047	5,2806	4,8455	7,1746	5,2531	4,7659	6,6082
RSD	7,82	9,62	9,69	7,75	5,06	4,99	5,37	4,91	7,26	5,37	4,91	6,84

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица Б.5 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №4

№	Образец состава лекарственного средства №4, порошок 131 мг мг. Серия № 42306											
	Среда: Казеинат натрия/Крахмал (1:1) рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	55,00	70,49	85,79	93,44	104,37	88,25	97,54	99,45	102,73	90,71	88,25	88,25
2	67,50	62,30	72,13	77,05	87,98	95,08	96,72	107,10	95,36	95,90	82,79	85,79
3	60,83	50,82	77,05	85,79	99,45	101,09	93,99	90,44	88,80	93,17	90,16	77,32
4	51,67	60,66	80,87	75,96	93,44	90,71	100,27	89,62	98,91	99,73	95,90	93,72
5	65,00	65,57	71,04	100,00	74,86	99,73	102,19	103,83	90,16	88,25	90,16	89,34
6	62,50	55,74	69,40	90,16	100,55	95,36	102,19	100,27	88,25	93,99	97,54	105,74
7	47,50	63,93	81,97	93,99	85,79	99,45	90,98	87,70	93,44	97,27	92,90	93,44
8	64,17	68,85	76,50	84,70	88,52	98,36	101,09	88,52	96,45	98,09	105,46	92,62
9	58,33	65,57	85,79	99,45	86,89	107,38	104,64	104,64	105,19	90,98	88,80	100,27
10	54,17	68,85	65,57	97,81	101,64	91,53	86,61	102,46	102,46	96,99	87,16	85,25
11	57,50	67,21	87,43	92,35	95,08	93,99	86,34	93,72	92,35	100,82	100,00	88,80
12	59,17	55,74	89,07	90,71	101,64	92,08	94,54	87,16	97,54	89,89	91,80	95,08
Метрологические измерения												
Q	58,61	62,98	78,55	90,12	93,35	96,08	96,43	96,24	95,97	94,65	92,58	91,30
S ² _x	3,43×10 ¹	3,78×10 ¹	6,07×10 ¹	6,32×10 ¹	7,67×10 ¹	2,87×10 ¹	3,72×10 ¹	5,55×10 ¹	3,17×10 ¹	1,68×10 ¹	3,89×10 ¹	5,43×10 ¹
CO	5,8531	6,1521	7,7914	7,9477	8,7582	5,3545	6,0978	7,4481	5,6310	4,0983	6,2336	7,3682
RSD	9,99	9,77	9,92	8,82	9,38	5,57	6,32	7,74	5,87	4,33	6,73	8,07

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица Б.6 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №5

№	Образец состава лекарственного средства №5, порошок 136 мг мг. Серия № 52806											
	Среда: Казеинат натрия/Крахмал (1:1) рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	43,33	60,66	80,33	72,13	91,80	84,97	92,08	95,63	85,25	97,27	88,80	95,36
2	40,83	65,57	78,69	79,78	84,15	96,99	99,45	92,35	84,43	87,43	89,89	93,44
3	38,33	63,93	72,68	74,32	70,49	87,70	87,43	90,44	92,90	99,18	83,88	92,35
4	49,17	55,74	75,41	83,61	88,52	83,33	95,90	93,72	97,81	79,51	98,09	88,80
5	49,17	60,66	76,50	73,77	77,05	82,24	93,72	86,07	91,80	98,63	86,61	97,54
6	37,50	52,46	62,30	92,35	90,71	86,89	95,63	89,62	96,17	88,25	99,73	90,71
7	45,00	50,82	66,67	84,70	70,49	90,44	90,98	88,25	89,07	83,06	83,61	81,42
8	49,17	45,90	76,50	90,71	86,34	94,54	85,79	93,17	82,24	93,44	79,78	98,36
9	40,00	55,74	57,92	66,12	87,98	87,16	89,07	90,16	95,36	89,62	98,91	79,23
10	45,00	57,38	65,57	81,42	93,99	93,72	89,34	85,25	93,17	98,91	92,08	84,43
11	48,33	62,30	66,12	77,60	91,80	78,14	88,52	92,90	94,26	90,71	85,79	84,15
12	48,33	59,02	69,40	85,25	93,44	96,72	94,81	98,91	87,70	80,87	99,45	97,81
Метрологические измерения												
Q	44,51	57,51	70,67	80,15	85,56	88,57	91,89	91,37	90,85	90,57	90,55	90,30
S ² x	1,98×10 ¹	3,30×10 ¹	4,99×10 ¹	6,03×10 ¹	7,10×10 ¹	3,62×10 ¹	1,66×10 ¹	1,52×10 ¹	2,54×10 ¹	5,01×10 ¹	4,93×10 ¹	4,45 ×10 ¹
CO	4,4446	5,7413	7,0649	7,7642	8,4284	6,0130	4,0765	3,9050	5,0373	7,0756	7,0245	6,6708
RSD	9,98	9,98	10,00	9,69	9,85	6,79	4,44	4,27	5,54	7,81	7,76	7,39

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица Б.7 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №6

№	Образец состава лекарственного средства №6, порошок 136 мг мг. Серия № 63006											
	Среда: Казеинат натрия/Крахмал (1:1) рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	43,33	63,93	79,23	80,33	95,08	95,08	93,99	96,99	94,54	93,44	93,99	84,97
2	47,50	67,21	82,51	94,54	71,58	86,34	100,27	93,17	91,26	87,16	96,72	96,45
3	52,50	62,30	84,70	78,14	80,33	92,35	92,62	99,45	93,17	89,07	92,35	99,18
4	57,50	57,38	76,50	86,34	91,80	91,26	88,52	83,88	89,07	87,70	94,81	86,07
5	49,17	60,66	80,87	81,97	90,16	80,60	90,44	91,26	98,36	88,80	86,89	88,80
6	45,00	65,57	72,68	89,62	91,26	95,08	92,08	98,63	92,62	92,90	100,55	83,88
7	41,67	57,38	67,76	83,06	84,15	99,73	95,36	92,08	92,90	97,54	80,60	98,09
8	49,17	59,02	65,57	87,98	92,35	98,09	90,98	100,27	100,00	93,99	85,52	88,25
9	53,33	55,74	77,05	84,15	74,32	80,05	87,70	91,53	83,61	83,88	91,80	94,26
10	55,83	52,46	79,23	83,61	97,81	96,72	93,99	85,25	85,25	95,63	96,72	91,26
11	47,50	63,93	78,14	89,07	95,08	91,53	100,00	87,98	98,91	98,36	90,98	89,89
12	53,33	55,74	84,70	86,34	93,44	87,98	86,61	97,27	88,80	95,36	85,79	85,52
Метрологические измерения												
Q	49,65	60,11	77,41	85,43	88,11	91,23	92,71	93,15	92,37	91,99	91,39	90,55
S ² _x	2,46 × 10 ¹	2,07 × 10 ¹	3,71 × 10 ¹	2,03 × 10 ¹	7,32 × 10 ¹	4,12 × 10 ¹	1,90 × 10 ¹	3,04 × 10 ¹	2,68 × 10 ¹	2,08 × 10 ¹	3,30 × 10 ¹	2,82 × 10 ¹
CO	4,9551	4,5481	6,0909	4,5081	8,5552	6,4156	4,3581	5,5170	5,1781	4,5635	5,7436	5,3101
RSD	9,98	7,57	7,87	5,28	9,71	7,03	4,70	5,92	5,61	4,96	6,28	5,86

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²_x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица Б.8 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №7

№	Образец состава лекарственного средства №7, порошок 136 мг. Серия № 70507											
	Среда: Казеинат натрия/Крахмал (1:1) pH=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	52,50	57,38	77,60	81,42	89,62	88,25	93,72	94,26	90,71	104,37	95,36	87,16
2	50,83	65,57	78,14	91,80	95,08	100,27	90,44	103,83	106,83	93,99	92,08	92,90
3	55,83	60,66	79,78	80,87	88,52	95,63	96,17	90,44	97,81	90,16	94,81	99,73
4	63,33	59,02	79,23	81,97	89,62	90,71	89,34	87,43	100,27	86,61	86,89	89,62
5	59,17	60,66	80,33	95,08	96,17	99,45	94,81	85,79	96,99	104,10	89,34	90,98
6	50,00	57,38	71,04	93,99	97,27	101,91	93,99	104,64	93,72	96,72	91,80	92,62
7	52,50	55,74	73,22	80,87	97,81	96,99	89,62	96,72	89,89	94,81	106,01	92,62
8	67,50	65,57	89,07	84,15	81,97	87,70	100,82	100,00	94,54	90,71	89,62	98,91
9	55,83	63,93	85,25	85,79	96,72	100,55	103,01	106,01	92,35	93,72	94,54	86,61
10	59,17	62,30	59,56	94,54	92,90	90,16	102,19	89,62	94,26	101,91	93,99	92,08
11	55,83	65,57	74,86	93,44	98,91	95,36	103,83	92,35	99,73	94,26	96,45	96,45
12	51,67	73,77	72,68	95,63	97,81	92,35	90,98	100,82	96,72	90,44	98,63	97,81
Метрологические измерения												
Q	56,18	62,30	76,73	88,30	93,53	94,95	95,74	95,99	96,15	95,15	94,13	93,12
S ² x	2,83×10 ¹	2,49×10 ¹	5,59×10 ¹	3,92×10 ¹	2,63×10 ¹	2,53×10 ¹	2,94×10 ¹	4,92×10 ¹	2,21×10 ¹	3,25×10 ¹	2,49×10 ¹	1,88×10 ¹
CO	5,3236	4,9920	7,4797	6,2585	5,1253	5,0292	5,4177	7,0167	4,6999	5,6993	4,9940	4,3339
RSD	9,48	8,01	9,75	7,09	5,48	5,30	5,66	7,31	4,89	5,99	5,31	4,65

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

Таблица Б.9 – Результаты исследования высвобождения образцов состава лекарственного средства №8

№	Образец состава лекарственного средства №8, порошок 136 мг. Серия № 80707											
	Среда: Казеинат натрия/Крахмал (1:1) рН=6,2±0,2											
	Время отбора/ высвобождение фермента											
	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	90 мин	120 мин	150 мин	180 мин	210 мин	240 мин	270 мин
1	55,83	55,74	69,95	89,62	92,90	97,27	90,16	89,34	97,27	86,34	93,17	88,25
2	53,33	57,38	86,34	83,61	89,62	85,79	93,17	85,25	87,98	88,52	86,07	89,89
3	52,50	52,46	75,96	88,52	89,62	98,36	95,63	90,44	96,17	87,43	93,99	87,98
4	60,83	60,66	78,14	72,68	94,54	86,89	100,00	89,89	90,71	90,98	92,35	84,97
5	61,67	59,02	71,58	91,80	91,26	99,45	94,81	85,79	95,08	88,80	93,17	86,07
6	48,33	52,46	84,15	87,98	84,70	94,26	89,34	105,46	86,07	96,72	90,98	93,44
7	46,67	50,82	76,50	84,70	89,62	93,17	96,72	84,97	94,54	99,73	88,52	86,61
8	51,67	52,46	78,69	73,77	96,72	98,63	87,16	93,17	92,35	97,54	89,34	95,08
9	47,50	62,30	80,87	90,71	89,07	94,54	102,19	104,92	87,16	97,27	106,01	85,25
10	60,83	47,54	75,41	98,36	89,62	92,62	95,36	100,27	90,16	96,99	87,16	88,52
11	53,33	62,30	63,39	85,79	86,89	86,89	91,26	103,28	92,62	92,08	95,36	89,89
12	50,83	47,54	83,61	88,52	93,99	95,90	86,61	96,45	106,56	89,07	82,79	86,89
Метрологические измерения												
Q	53,61	55,05	77,05	86,34	90,71	93,65	93,53	94,10	93,06	92,62	91,58	88,57
S ² x	2,73×10 ¹	2,81×10 ¹	4,27×10 ¹	5,20×10 ¹	1,13×10 ¹	2,31×10 ¹	2,35×10 ¹	5,99×10 ¹	3,09×10 ¹	2,23×10 ¹	3,42×10 ¹	9,73
CO	5,2264	5,2987	6,5325	7,2081	3,3685	4,8108	4,8518	7,7424	5,5598	4,7252	5,8459	3,1192
RSD	9,75	9,62	8,48	8,35	3,71	5,14	5,19	8,23	5,97	5,10	6,38	3,52

Примечания: Q – средние значение высвобождения фермента, S²x – дисперсия; CO – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, %

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Акты внедрения

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебно-воспитательной
работе ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
Т.М. Литвинова



2022 г.

АКТ

внедрения в учебный процесс

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет) результатов диссертационного исследования
Каргина Владимира Сергеевича на тему: «Разработка состава и технологии получения
лекарственного ранозаживляющего средства пролонгированного действия на основе
биоразлагаемых полимеров»

Мы, нижеподписавшиеся, д.ф.н., профессор, заведующий кафедры промышленной фармации Пятигорская Наталья Валерьевна, академик РАН, д.т.н., профессор кафедры промышленной фармации Береговых Валерий Васильевич, к.ф.н., доцент кафедры промышленной фармации Бркич Галина Эдуардовна удостоверяем факт внедрения результатов научной работы Каргина В.С. в учебный процесс кафедры промышленной фармации Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Материалы исследования используются при чтении лекций и проведении семинаров для студентов магистратуры промышленная фармация и при подготовке учебных материалов для слушателей курсов дополнительного профессионального образования.

Зав. кафедры промышленной фармации
д.ф.н., профессор

Н.В. Пятигорская

Профессор кафедры промышленной
фармации д.т.н., профессор, академик РАН

В.В. Береговых

Доцент кафедры промышленной
фармации, к.ф.н.

Г.Э. Бркич

Начальник Учебного управления
к.м.н

Л.Ю. Юдина

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по
инновационным проектам
ООО «Тульская фармацевтическая
фабрика», кандидат фармацевтических наук
Я.Э. Безчинский


«26»  2022 г.

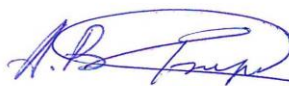
АКТ №128

внедрения результатов научно-исследовательской работы

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе представителей ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» – главный инженер Бирюков А.В., заведующий контрольно-аналитической лаборатории Демерлий А.М., начальник отдела обеспечения качества – уполномоченное лицо Ларионов Д.Ю. составили настоящий акт о проведении апробации в условиях производства технологии получения лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения» по ОИР 178.04-2022. Данное предложение было разработано в ходе выполнения научно-исследовательской работы по теме: «Разработка состава и технологии получения лекарственного ранозаживляющего средства пролонгированного действия на основе биоразлагаемых полимеров» в условиях контрольно-аналитической лаборатории ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» в условиях и на производственной площадке ООО «Тульская фармацевтическая фабрика».

Опытно-промышленный регламент на лекарственное средство «Порошок биоразлагаемый для местного применения» может быть рекомендован к внедрению в производство ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» с использованием стандартного оборудования.

Главный инженер



А.В. Бирюков

Заведующий КоАЛ



А.М. Демерлий

Начальник отдела обеспечения качества
уполномоченное лицо

Д.Ю. Ларионов

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по
инновационным проектам
ООО «Тульская фармацевтическая
фабрика», кандидат фармацевтических наук
Я.Э. Безчинский




АКТ №129

внедрения результатов научно-исследовательской работы

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе представителей ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» – главный инженер Бирюков А.В., заведующий контрольно-аналитической лаборатории Демерлий А.М., начальник отдела обеспечения качества – уполномоченное лицо Ларионов Д.Ю. составили настоящий акт о проведении апробации в условиях производства и контроля качества разработанных аналитических методик определения качества лекарственного средства «Порошок биоразлагаемый для местного применения».

Данное предложение было разработано в ходе выполнения научно-исследовательской работы по теме: «Разработка состава и технологии получения лекарственного ранозаживляющего средства пролонгированного действия на основе биоразлагаемых полимеров» в условиях контрольно-аналитической лаборатории ООО «Тульская фармацевтическая фабрика».

Данное внедрение может быть использовано для разработки проекта нормативной документации на лекарственный препарат для дальнейшего производства на ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» с использованием стандартного оборудования.

Главный инженер



А.В. Бирюков

Заведующий КоАЛ



А.М. Демерлий

Начальник отдела обеспечения качества
уполномоченное лицо


Д.Ю. Ларионов

ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Титульный лист опытно-промышленного регламента

ООО «ТУЛЬСКАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ФАБРИКА»

Для служебного пользования

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Тулская фармацевтическая фабрика»


И.А. Рабинович
«16» _____ 2022 г.

**ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ
ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА
Порошок биоразлагаемый для местного применения
ОПР 178.04-2022**

Срок действия регламента до 31.04.2027 г.

Москва 2022