

На правах рукописи

Алешин Сергей Валерьевич

Разработка подходов к стандартизации инновационного лекарственного средства в рамках реализации программы стратегии Фарма 2020

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2018

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,
профессор

Раменская Галина Владиславовна

Официальные оппоненты:

Эпштейн Наталья Борисовна – доктор фармацевтических наук, профессор, Обнинский институт атомной энергетики – филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (ИАТЭ НИЯУ МИФИ), начальник фармацевтического центра практического обучения и компетенций;

Перова Ирина Борисовна – кандидат фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии», лаборатория метаболомного и протеомного анализа, научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России).

Защита состоится «_____» _____ 2018 г. в ____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13.

С диссертации можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Минздрава России по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации <http://sechenov.ru/>.

Автореферат разослан _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Диссертационного Совета Д 208.040.09

доктор фармацевтических наук, профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Заболевания, вызванные вирусом простого герпеса, опоясывающего герпеса, вирусом Эпштейна-Барра и цитомегаловирусом являются одними из самых распространенных в человеческой популяции среди вирусных инфекций. Данные заболевания способны в значительной степени снижать показатели качества жизни пациентов, а в отдельных случаях приводить к серьезным осложнениям, вплоть до летального исхода. Распространенность данных заболеваний, а также присущая их возбудителям высокая способность к адаптации, являются причинами актуальности создания новых, эффективных и безопасных лекарственных препаратов, направленных на борьбу с ними. Кроме того, разработка и производство инновационных лекарственных средств является одной из основных задач, стоящих перед российской фармацевтической отраслью в рамках реализации Стратегии развития Фарма 2020.

Ациклогерманий представляет собой оригинальное комплексное соединение, синтезированное российской компанией «ВДС Фарма». Данное вещество обладает, с одной стороны, выраженным вирустатическим действием, реализуемым благодаря фрагменту ацикловира, который, в составе комплексной молекулы, обладает более высокими показателями растворимости в биоревалентных средах и биодоступности, по сравнению с присутствующими на рынке препаратами ацикловира, а с другой, предположительно, оказывает дополнительный иммуномодулирующий эффект, характерный для германийорганических лекарственных средств. Таким образом, препарат, предположительно, реализует комплексный подход к терапии, направленный, с одной стороны, на ликвидацию возбудителя заболевания, а с другой на активацию собственного иммунного ответа организма.

Стандартизация и разработка нормативной документации для инновационного лекарственного средства, как для фармацевтической

субстанции, так и для лекарственной формы, является необходимым этапом разработки препарата и его внедрения в клиническую практику. Исходя из этого, разработка методик анализа и установления норм качества ациклогермания является актуальной проблемой.

Степень разработанности темы исследования

На момент начала работы по теме диссертации не существовало нормативной документации для субстанции и лекарственной формы ациклогермания, методики для качественной и количественной оценки данного комплексного соединения не были предложены, состав примесей, присутствующих в субстанции и лекарственной форме, являлся неизученным»

Цель исследования

Целью настоящей работы являлось изучение физико-химических свойств и стандартизация инновационного лекарственного средства ациклогермания (фармацевтической субстанции и лекарственной формы).

Задачи исследования

1. Изучить физико-химические свойства субстанции ациклогермания (растворимость, прозрачность, цветность, pH водного раствора).
2. Изучить спектральные характеристики субстанции ациклогермания, методами ИК-, УФ- атомно-абсорбционной спектроскопии, с целью оценки возможности их использования при стандартизации субстанции ациклогермания.
3. Изучить хроматографическую подвижность фрагмента ацикловира в составе ациклогермания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ- и МС-МС детектированием и оценить возможность использования данных методов для качественного и количественного анализа, а также анализа примесей в субстанции ациклогермания.
4. Разработать методику анализа чистоты субстанции ациклогермания, произвести идентификацию основных примесей.

5. Произвести изучение лабораторных образцов ациклогермания в соответствии с разработанными ранее методами. На основании полученных данных определить нормы качества для субстанции ациклогермания.

6. Изучить физико-химические свойства и установить нормы качества для ациклогермания в мягкой лекарственной форме (геле).

7. Изучить стабильность и установить сроки годности лекарственной формы (геля) ациклогермания.

8. На основании полученных данных разработать проекты нормативной документации для субстанции ациклогермания и лекарственной формы (водорастворимого геля).

Научная новизна исследования

В рамках проведенного исследования впервые изучены физико-химические свойства нового оригинального комплексного соединения ациклогермания. Изучены его спектральные характеристики с использованием УФ-, ИК-, атомно-абсорбционной спектрометрии. Изучена хроматографическая подвижность фрагмента ацикловира в составе ациклогермания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ и МС-МС детектированием, подобраны оптимальные условия элюирования, позволяющие добиться максимального разделения ацикловира и примесей.

Изучено воздействие стрессовых факторов на стабильность субстанции, проведено определение сроков годности методом ускоренного старения.

Обнаружена и идентифицирована основная примесь ациклогермания, а также предложена методика ее количественной оценки. Впервые определены основные показатели качества и разработаны методики фармацевтического анализа для субстанции и мягкой лекарственной формы ациклогермания.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Представленный в работе экспериментально-практический материал может служить теоретической базой для разработки комплекса методик анализа

стандартных образцов других комплексных соединений лекарственных средств с производными германия.

На основании проведенных исследований разработаны методики фармацевтического анализа субстанции ациклогермания. Разработаны методики анализа для мягкой лекарственной формы. Оформлены проекты НД для субстанции и мягкой лекарственной формы. Результаты исследований внедрены в практическую деятельность компании и частично использованы при внедрении в производство стоматологического геля Герпенокс, запатентованного средства для комплексного лечения и профилактики инфекционно-воспалительных состояний и микротравм слизистой оболочки полости рта, красной каймы губ и кожи вокруг них, в том числе вызванных вирусом герпеса; регистрационный номер: РЗН 2013/526.

Основные положения, выносимые на защиту

- Результаты исследования по разработке методик анализа и установления норм качества для субстанции ациклогермания, используемой для производства мягкой лекарственной формы, влияние различных факторов на качество субстанции.
- Результаты исследования по разработке норм качества и методик анализа мягкой лекарственной формы ациклогермания.
- Результаты по изучению стабильности при различных режимах хранения для субстанции и лекарственной формы ациклогермания.

Методология и методы исследования

Физико-химические свойства ациклогермания изучены в соответствии с требованиями ОФС ГФ XIII. Спектральные свойства субстанции ациклогермания были изучены методами УФ-, ИК- и атомно- абсорбционной спектromетрии. Количественное определение и идентификация примесей осуществлялась методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС. Валидация разработанных аналитических методик осуществлялась в соответствии с требованиями ОФС ГФ XIII (ОФС.1.1.0012.15).

Достоверность научных положений и выводов

Диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне. В ходе выполнения исследования использованы современные фармакопейные методы (ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС/МС и другие), соответствующие поставленным целям и задачам. Экспериментальные данные, полученные автором, достоверны, обработаны с применением методов современной статистики. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы, достоверны и логично вытекают из полученных автором экспериментальных данных. Первичная документация исследования проверена и соответствует материалам, содержащимся в работе.

Апробация результатов исследования

Материалы исследования были изложены на конференции «Достижения и перспективы молодых ученых НИИФ (результаты работы дипломников / аспирантов / докторантов / соискателей)» (Москва, 2015 г.), на Факультетской научно-практической конференции, посвященной 110-летию со дня рождения Заслуженного деятеля науки СССР, д.б.н., профессора Швайковой М.Д. (Москва, 2015 г.), на VII Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2018 г.). Апробация работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (28.04.2018).

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе темы исследования, постановке цели и задач работы; планировании и реализации эксперимента, обработке экспериментальных данных, их обобщении и систематизации, формулировке общих выводов; докладах и публикациях.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования, в том числе разработанные методики контроля качества, внедрены в практическую деятельность компании «WDS Фарма», связанную с производством стоматологического геля Герпенекс© R.O.C.S.© (ООО «ЕВРОКОСМЕД-Ступино»).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, пункту 3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления».

Связь исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа была выполнена в рамках комплексной темы Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств, № гос. Регистрации 01201261653. Тема работы включена в план научных исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств».

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 142 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 33 рисунками. Список литературы включает 108 источников, в том числе 41 – на иностранных языках.

Публикации

Основное содержание, результаты исследования и выводы отражены в 6 публикациях, в том числе 3 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования

Объектами исследования являлись образцы субстанции нового комплексного лекарственного препарата ациклогермания, промежуточные продукты его синтеза, компоненты комплексной молекулы (ацикловир, лимонная кислота, гуанин), а также образцы лекарственной формы (гель 3%). Экспериментальные образцы субстанции и лекарственной формы были синтезированы ООО «ВДС Фарма».

Таблица 1. Компоненты лекарственной формы ациклогермания (гель)

№	Наименование	Значение
1	Вода очищенная	растворитель
2	Пропиленгликоль	гелеобразователь [31]
3	Ациклогерманий	действующее вещество
4	Гидроксиэтилцеллюлоза	гелеобразователь
5	Натрия альгинат	гелеобразователь [5]
6	Полисорбат	солубилизатор
7	Метилпарабен	консервант
	Ксилитол	коррегент вкуса [25, 26]
8	Ментол	ароматизатор

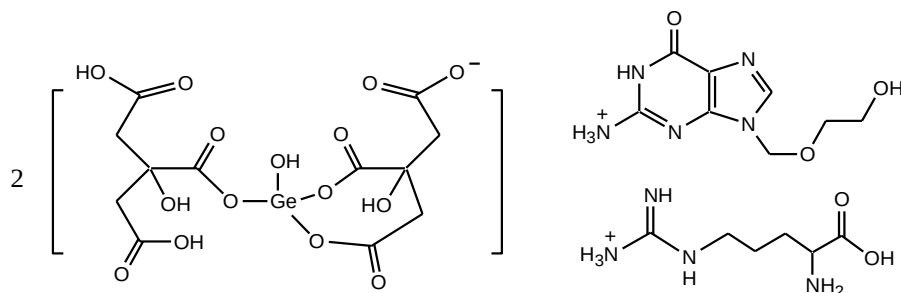


Рисунок 1. Структурная формула ациклогермания

Материалы и методы исследования

Изучение физико-химических свойств ациклогермания, разработку методик анализа, установление сроков годности и научно-обоснованных норм качества субстанции осуществляли на базе Лаборатории Фармакокинетики НИИ Фармации Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, а также ООО «Центр фармацевтической аналитики». Хроматографический анализ ациклогермания методом ВЭЖХ проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1290 series, с УФ-детектором, США, (обработку данных производили при помощи ПО Agilent Chemstation v. 7.1), а также с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1290 series, с масс-селективным детектором с тройным квадруполом (6410), обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Mass Hunter Quantitative Analysis, версия B.03.01, Agilent Technologies. Идентификацию основной примеси осуществляли с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Waters Acquity H-class system с масс-селективным детектором (обработку данных проводили при помощи ПО MassLynx v 4.1, Waters).

Изучение субстанции ациклогермания методом атомно-абсорбционной спектроскопии проводилось на спектрометре с электротермической атомизацией (ЭТА) и зеэмановской коррекцией неселективного поглощения модели Люмэкс МГА-915МД, с использованием лампы с полым германиевым катодом.

Изучение pH водного раствора субстанции ациклогермания осуществляли при помощи pH-метра лабораторного S220 SevenCompact (Mettler Toledo Швейцария).

Изучение спектральных характеристик ациклогермания а также компонентов комплексной молекулы осуществляли при помощи ИК Фурье спектрофотометра ФСМ 1201 (ООО Инфраспек, Россия).

Изучение стабильности и установление срока годности хранения ациклогермания методом ускоренного старения осуществляли с использованием термостата FD 53 (Binder, Германия).

Изучение реологических свойств геля ациклогермания осуществлялось с использованием ротационного вискозиметра Lamy Rheology RM 200 с коаксильными цилиндрами ms din 33 объемом 17 мл, программное обеспечение RHEOMATIK (Франция).

Результаты исследования

В **Главе 1** диссертационной работы предоставлен анализ отечественных и зарубежных публикаций в научных изданиях, нормативных документов и патентов, посвященных сущности Стратегии Фарма 2020, классификации и краткой характеристики фармакологического действия противовирусных лекарственных препаратов, в том числе, более подробно, предназначенных для терапии заболеваний, вызванных вирусом простого герпеса, *Varicella zoster*, вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса. Кроме того, отдельное внимание уделено истории и современной практике использования германийсодержащих лекарственных препаратов в противовирусной терапии, истории создания и результатам доклинических исследований собственно ациклогермания, а также современным требованиям к структуре и принципам создания нормативной документации для фармацевтических субстанций и мягких лекарственных форм.

Глава 2 посвящена изучению физико-химических свойств и разработке методов анализа ациклогермания. Начало главы содержит перечень объектов исследования, использованных реактивов, растворителей и оборудования. Основное содержание главы составляет описание процесса и результатов исследования физико-химических свойств субстанции ациклогермания, а именно внешнего вида субстанции, растворимости субстанции в различных растворителях (воде очищенной, метаноле, диэтиловом эфире, хлороформе и гексане), прозрачности и цветности водного раствора субстанции, pH водного

раствора, и его сравнение с рН водного раствора ацикловира, изучение спектральных характеристик субстанции. Последнее включает в себя спектрометрию в инфракрасной области, включая расшифровку ИК-спектра, атомно-абсорбционную спектрометрию с целью разработки методики качественного и количественного определения германия, УФ- и масс-спектрометрический анализ, совмещенный с ВЭЖХ. Разработанные методики количественного определения и качественного анализа валидированны, результаты валидационных испытаний включены в главу. Подробные результаты исследования изложены далее.

Растворимость.

Таблица 2. Растворимость субстанции ациклогермания

Растворитель	Степень растворимости ациклогермания
Вода	Очень легко растворим
Метанол	Мало растворим
Диэтиловый эфир	Мало растворим
Хлороформ	Мало растворим
Гексан	Очень мало растворим

Согласно требованиям рекомендациям, изложенным в ГФ XIII, (не рекомендуется использование легкокипящих и легковоспламеняющихся или очень токсичных растворителей), а также принимая во внимание индивидуальные особенности исследуемой субстанции, было принято решение включить в проект нормативной документации испытание с использованием трех растворителей: воды очищенной, метанола и хлороформа.

Прозрачность и цветность раствора субстанции ациклогермания.

Было проведено изучение прозрачности 1% водного раствора субстанции ациклогермания. Исследование проводилось в соответствии с требованиями ГФ XIII, для трех образцов субстанции, соответствующих разным производственным циклам. По результатам испытания было установлено, что раствор является прозрачным.

Было проведено изучение цветности 1% водного раствора субстанции ациклогермания. Исследование проводилось в соответствии с требованиями ГФ XIII, для трех образцов субстанции, соответствующих разным производственным циклам. По результатам испытания было установлено, что раствор является бесцветным.

РН водного раствора.

По результатам исследования было установлено, что значение рН 1% водного раствора ациклогермания достоверно укладывается в диапазон от 2,0 до 2,2. Кислая реакция среды субстанции может быть обусловлена наличием в ее составе фрагмента лимонной кислоты, что было подтверждено соответствующим исследованием.

Спектрометрия в инфракрасной области при анализе ациклогермания.

В качестве основного метода идентификации субстанции ациклогермания был предложен метод спектрометрии в инфракрасной области, описанный в ГФ XIII (в таблетках с калия бромидом). При изготовлении образцов методом прессования таблеток в качестве матрицы используется чистый калия бромид, не содержащий посторонних полос поглощения, предварительно размельченный и осушенный. ИК-спектр субстанции ациклогермания, снятый в области от 4000 до 500 см⁻¹ в диске с калия бромидом, по положению полос поглощения должен соответствовать эталонному ИК-спектру.

Было произведено исследование ИК-спектров ациклогермания, а также субстанций его структурных компонентов (ацикловира, аргинина и лимонной кислоты), с целью сопоставления полученных спектров и идентификации характеристических полос поглощения ациклогермания. При исследовании образцов ациклогермания методом спектрометрии в инфракрасной области отмечены следующие характеристические полосы поглощения:

- Широкая полоса поглощения с максимумами при 3443 и 3380 см⁻¹ (валентные колебания N-H в лактамной форме фрагмента ацикловира и NH₂- группе аргинина).

- Широкая полоса поглощения с максимумами при 1724, 1670 см^{-1} (валентные колебания $\text{C}=\text{O}$ в лактамной форме сложноэфирной связи и карбоксильной группы и валентное колебание $\text{C}=\text{NH}$, неразделяемое перекрывание ряда полос).

Полученные данные соответствуют теоретическим представлениям о химической структуре ациклогермания.

Атомно-абсорбционная спектрометрия фрагмента германия в составе ациклогермания.

Для определения фрагмента германия в составе ациклогермания был предложен метод атомно-абсорбционной спектрометрии, сочетающий относительную простоту анализа и пробоподготовки, а также высокую селективность.

В качестве стандарта был использован раствор германия диоксида (Germanium Oxide, ESPI Metals, США) в воде очищенной (класс чистоты Milli-Q).

Проведены испытания растворов с различной концентрацией германия (по три испытания для каждой концентрации) и на основании полученных данных построен первичный калибровочный график. Для фармакопейной методики было предложено использовать построение калибровочного графика по трем точкам, используя диапазон концентраций стандартного раствора, обладающий наибольшей линейностью, 1, 5 и 10 мкг/мл . Исходя из полученных данных, а также информации о строении комплексной молекулы ациклогермания, предложены методики приготовления стандартных и испытуемых растворов, а также расчетная формула содержания германия.

ВЭЖХ при анализе ациклогермания

В качестве основного метода качественного и количественного определения фрагмента ацикловира в составе субстанции ациклогермания было предложено использование ВЭЖХ с УФ-детектом.

В результате исследования образца ациклогермания в соответствии с взятой за

основу методикой из Европейской фармакопеи 8.0 была обнаружена ее недостаточная пригодность для переноса в проект НД для ациклогермания без изменений, так как: время удерживания ацикловира на хроматограмме образца ациклогермания и на хроматограмме стандартного раствора ацикловира значительно различалось, а также коэффициент разрешения, рассчитанный для пиков основного вещества и основной примеси на хроматограмме образца ациклогермания составлял менее 1.

Данный результат предположительно может быть следствием значительной разницы значений рН водных растворов ацикловира, проявляющего слабощелочные свойства, и ациклогермания, дающего кислотные значения рН. Для подтверждения данного предположения было произведено исследование образца ацикловира, разведенного раствором ортофосфорной кислоты (рН 2,1) в соотношении 1 к 10. Время удерживания пика основного вещества на хроматограмме данного образца соответствовало времени удерживания на хроматограмме ациклогермания.

Таким образом, одним из главных критериев разрабатываемой ВЭЖХ методики качественного и количественного определения фрагмента ацикловира в составе ациклогермания являлось достижение высокого показателя устойчивости к изменению рН в данном диапазоне. Другим важным критерием являлось достижение пригодности разрабатываемой методики без изменения хроматографических условий для оценки примесей (коэффициент разрешения для пиков основного вещества и основной примеси должен быть более 1). Кроме того, важным критерием являлось достижение максимальной простоты и воспроизводимости методики. Нормы количественного содержания ацикловира в составе ациклогермания были рассчитаны исходя из информации о структуре комплексной молекулы.

Таблица 3. Хроматографические условия

Колонка	C18, 250 мм x 4,6 мм, 5 мкм
Температура колонки	25 °C
Подвижная фаза	Компонент А (фосфатный буферный раствор с pH 2,5) и Компонент Б (ацетонитрил для ВЭЖХ) в соотношении 94:6
Скорость потока	1 мл/мин
Детектор	УФ-детектор, длина волны 254± 4 нм
Объем пробы	10 мкл
Время анализа	10 мин

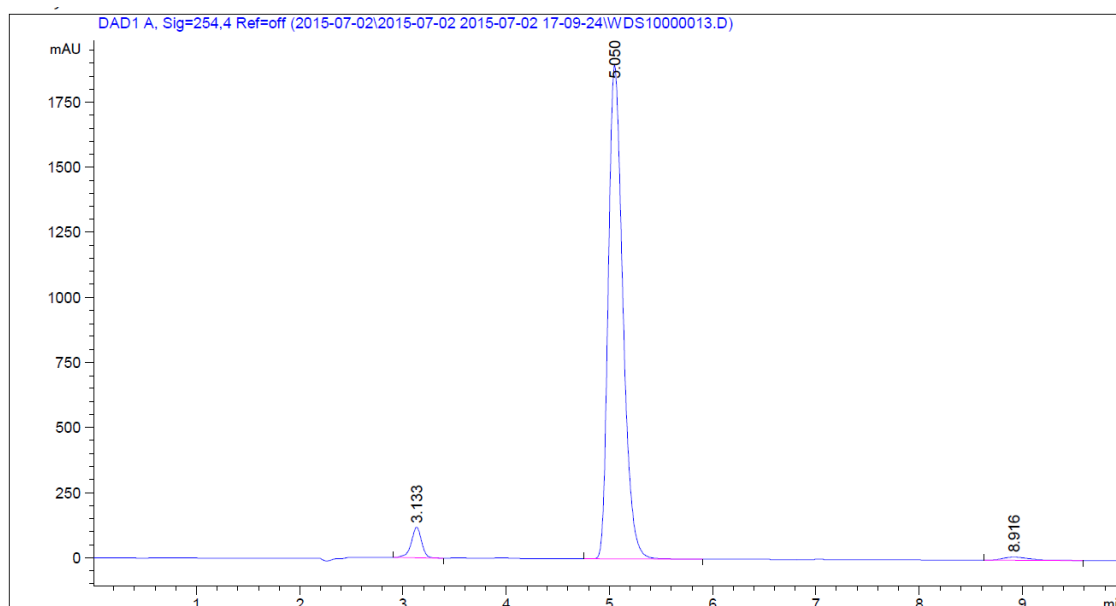


Рисунок 2. Хроматограмма образца ациклогермания, снятая в соответствии с разработанной методикой (образец ИВ-289, присутствуют пики примесей)

Валидация методики количественного определения фрагмента ацикловира в составе ациклогермания методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Была проведена валидация разработанной методики количественного определения ацикловира в фармацевтической субстанции.

Таблица 4. Основные валидационные характеристики

Валидационная характеристика	Концентрация образца	Результат	Критерий приемлемости	Вывод о соответствии
Специфичность	1 – раствор плацебо 2 – 100 мкг/мл	На хроматограмме растворителя и раствора плацебо отсутствовали пики с временем удерживания ацикловира	На хроматограмме плацебо должно быть пиков со временем удерживания исследуемого ЛВ	Соответствует
Аналитическая область (линейность)	10 мкг/мл 25 мкг/мл 50 мкг/мл 75 мкг/мл 100 мкг/мл	Коэффициенты корреляции $r > 0,9999$, $r > 0,9989$. Относительная погрешность измерений составила не более 1,4%	Коэффициент корреляции $r > 0,999$. Относительная погрешность измерений должна составлять не более 2%	Соответствует
Робастность	100 мкг/мл	RSD при использовании колонок разных производителей составило 0,76% , RSD при значениях pH компонента А подвижной фазы в диапазоне 2.4-2.6 составило 1,83%	RSD при использовании колонок разных производителей должно составлять не более 2% , RSD при значениях pH компонента А подвижной фазы в диапазоне 2.4-2.6 должно составлять не более 2%	Соответствует
Правильность (внутри цикла, intra-day)	10 мкг/мл 50 мкг/мл 100 мкг/мл	Относительная погрешность определений составила -0,72%, 0,88%, -1% соответственно.	Относительная погрешность определений должна составлять не более 2%	Соответствует
Прецизионность (внутри цикла, intra-day, мемантин)	10 мкг/мл 50 мкг/мл 100 мкг/мл	Относительное стандартное отклонение составило 0,61%, 0,44%, 0,42%, соответственно.	Относительное стандартное отклонение определений должно составлять не более 2% уровней.	Соответствует

Идентификация основной примеси ациклогермания.

Глава 2 содержит описание процесса идентификации и нормирования содержания основной примеси субстанции ациклогермания. При проведении хроматографического анализа образцов субстанции ациклогермания было установлено наличие характерного пика примеси с временем удерживания около 3 минут, время удерживания относительно пика ацикловира около 0.75. Спектр поглощения пика примеси, снятый при помощи применяемого для

хроматографического анализа УФ-детектера, в значительной степени совпадал с соответствующим спектром ацикловира. На основании проведенных исследований был сделан вывод о том, что основная примесь, имеющая на хроматограммах образцов ациклогермания (относительное время удерживания по ацикловиру около 0,75 и абсолютное около 3 минуты), с высокой вероятностью может являться гуанином. С целью проверки и подтверждения произведенной идентификации примеси было проведено УФ-спектрометрическое исследование образца стандартной субстанции гуанина.

В результате проведенного исследования было установлено, что время удерживания пика гуанина в условиях методики близко к времени удерживания пика основной примеси на хроматограмме образца ациклогермания, форма их спектров поглощения в УФ-области также совпадают.

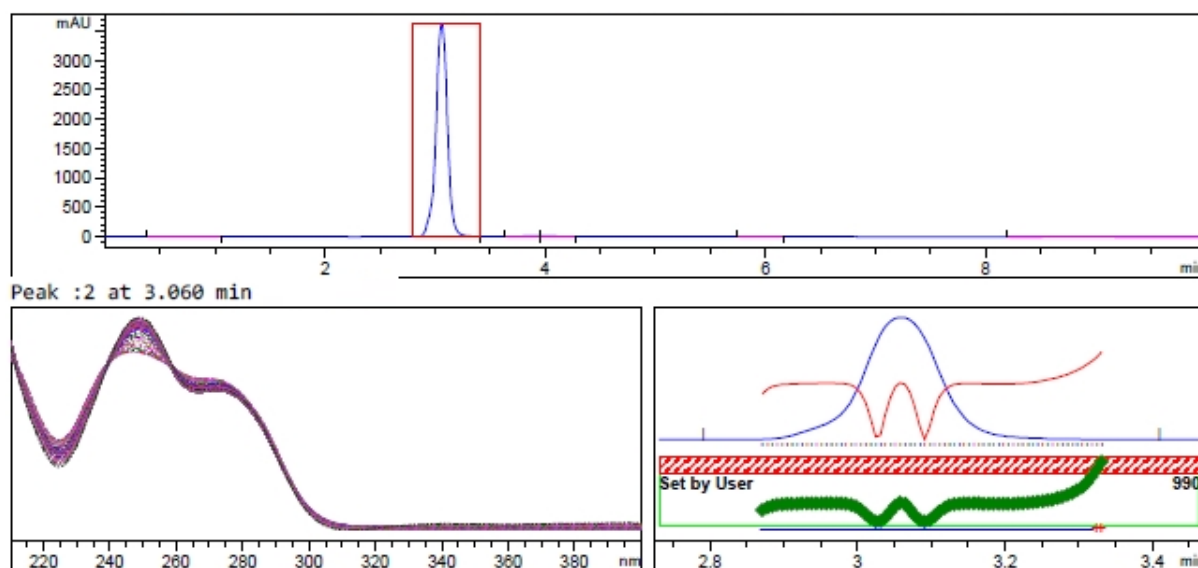


Рисунок 3. Оптический спектр основного пика на хроматограмме стандартного образца гуанина

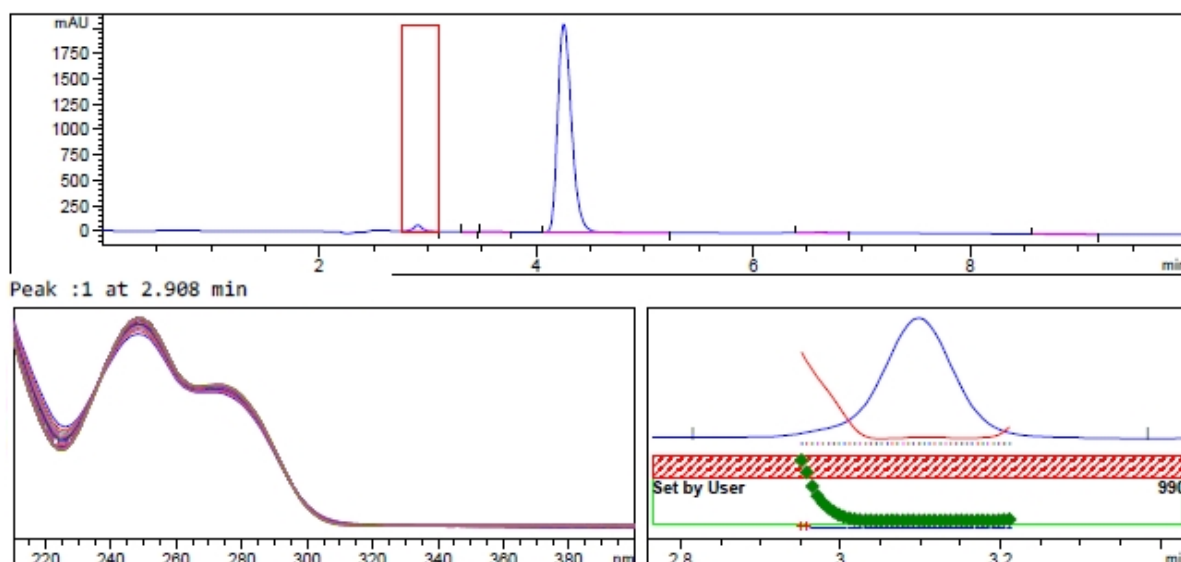


Рисунок 4. Оптический спектр пика основной примеси на хроматограмме образца ациклогермания.

Валидация методики количественного определения гуанина в субстанции ациклогермания методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Глава 2 содержит описание процесса разработки и валидации ВЭЖХ_методики определения гуанина как идентифицированной примеси в субстанции ациклогермания. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность.

Применение химических реакций для определения подлинности ациклогермания.

С целью подтверждения наличия в составе субстанции ациклогермания фрагмента аргинина была предложена реакция аргинина с α -нафтолом в присутствии окислителя (реакция Сакагучи). В качестве качественной реакции для обнаружения цитрат-иона была предложена реакция осаждения хлоридом кальция, являющаяся традиционной для данного соединения. В Главе 2 приводится описание методик предложенных химических реакций и результаты их валидации.

Глава 3 диссертации посвящена установлению норм качества лабораторных образцов субстанции ациклогермания с использованием разработанных ранее

методик. На основании полученных данных был подготовлен проект нормативной документации для субстанции ациклогермания, приведенный в Приложении 1 к диссертационной работе.

Глава 4 диссертации посвящена изучению физико-химических свойств и разработке методов анализа лекарственной формы ациклогермания (гель водорастворимый 3%). Глава содержит описание модификаций разработанных ранее методик качественного и количественного анализа ациклогермания для анализа лекарственной формы. Легкая водорастворимость геля ациклогермания, как основного действующего вещества, так и вспомогательных компонентов лекарственной формы, позволяет использовать для его анализа методы контроля качества для фармацевтической субстанции с минимальными модификациями. Для количественного определения и определения содержания примесей был предложен метод пробоподготовки, заключающийся в растворении навесок геля в воде с последующим фильтрованием. Навески образца геля брались по массе. Тексты модифицированных методик контроля качества для анализа геля ациклогермания приведены в Приложении 2 (Проект нормативной документации для лекарственной формы). Кроме того, глава содержит описание процесса установления срока хранения лекарственной формы ациклогермания методом ускоренного старения. В результате проведения процедуры ускоренного старения препарат показал критические несоответствия требованиям НД, а именно, недопустимое увеличение содержания основной примеси на контрольной точке, соответствующей полутора годам хранения (136 дней), после чего эксперимент был досрочно прекращен. Был сделан вывод о возможном разложении части основного вещества (фрагмента ацикловира) с образованием основной примеси. Для установления точных сроков годности препарата необходимы дальнейшие исследования стабильности при хранении при комнатной температуре.

Таблица 5. Исследование стабильности геля ациклогермания, серия 0915.

Показатели качества		В начале эксперимента	Сроки экспериментального хранения, соответствующие хранению в естественных условиях, мес.					
			6	12	18	24	30	36
Описание	Желтоватый гель с мятым запахом	Соответствует	–	–	–	N/A	N/A	N/A
Посторонние примеси	ВЭЖХ. Единичной неидентифицированной примеси должно быть не более 0,5%.	Соответствует, не более 0,1%	–	–	–	N/A	N/A	N/A
	ВЭЖХ. Содержание гуанина должно составлять не более 0,5 %.	Соответствует, 0,1%	0,15%	0,31%	2,9%	N/A	N/A	N/A
Количественное определение	Германий: Атомно-абсорбционная спектрометрия. Содержание германия в геле должно быть в пределах от 0,3% до 0,37%.	Соответствует, 0,34%	–	–	–	N/A	N/A	N/A
	Ацикловир: ВЭЖХ. Содержание ацикловира в геле должно быть в пределах от 0,47% до 0,57%	Соответствует, 0,48%	0,48%	0,48%	0,47%	N/A	N/A	N/A

ВЫВОДЫ

1. В рамках проведенного исследования изучены физико-химические свойства субстанции ациклогермания, используемой для производства мягкой лекарственной формы, геля (растворимость, прозрачность, цветность, pH водного раствора). В проект нормативной документации включено испытание растворимости с использованием одного растворителя, воды очищенной. Установлено, что раствор субстанции ациклогермания, изученный в соответствии с требованиями ГФ XIII, является прозрачным и бесцветным. Также было установлено, что значение pH 1% водного раствора ациклогермания достоверно укладывается в диапазон от 2,0 до 2,2.

2. Изучены спектральные характеристики субстанции ациклогермания, методами ИК-, УФ- ААС- и масс-спектрометрии, с целью оценки их возможности использования при стандартизации субстанции ациклогермания. В качестве основного метода идентификации субстанции ациклогермания предложен метод спектрометрии в инфракрасной области. Для определения фрагмента германия в составе ациклогермания предложен метод атомно-абсорбционной спектрометрии. Определен диапазон наибольшей линейности для определения германия методом ААС и на основании данной информации разработан метод количественного определения для субстанции.

3. Изучена хроматографическая подвижность фрагмента ацикловира в составе ациклогермания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ- и МС-МС детектированием. Методика количественного определения ацикловира в фармацевтической субстанции методом ВЭЖХ с УФ-детектированием была валидирована по основным валидационным параметрам. Также была разработана и валидирована альтернативная ВЭЖХ-методика количественного определения фрагмента ацикловира в составе ациклогермания, с использованием масс-селективного детектора с тройным квадруполем.

4. Разработана и валидирована ВЭЖХ-методика анализа чистоты субстанции ациклогермания, произведена идентификация основной примеси (гуанина) и предложена методика ее количественной оценки.

5. Произведено изучение лабораторных образцов ациклогермания в соответствии с разработанными ранее методами. На основании полученных данных определены нормы качества для субстанции ациклогермания.

6. Изучены физико-химические свойства и установлены нормы качества для ациклогермания в мягкой лекарственной форме (геле). Была подтверждена возможность использования для анализа водорастворимого геля ациклогермания методов контроля качества для фармацевтической субстанции с минимальными модификациями.

7. Изучена стабильность и установлены сроки годности лекарственной формы ациклогермания. Сделан вывод о возможном разложении части основного вещества (фрагмента ацикловира) с образованием гуанина в процессе хранения. Подтвержденный срок хранения препарата составил 1 год.

8. На основании полученных данных разработаны проекты нормативной документации для субстанции ациклогермания и лекарственной формы (водорастворимого геля).

Практические рекомендации

По результатам экспериментальных данных разработаны методики, которые может быть целесообразно использовать в контрольно-аналитических лабораториях для контроля качества ациклогермания, а также препаратов – производных ацикловира, и комплексных соединений германия. Результаты полученных исследований могут быть рекомендованы к использованию в учебном процессе по дисциплинам – фармацевтическая химия, аналитическая химия.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшие исследования могут быть направлены на разработку нормативной документации и методик контроля качества для иных

комплексных соединений германия с лекарственными препаратами, разрабатываемыми в соответствии с патентом РФ № 2475436 (Комплексные соединения германия с производными азотистых оснований пуринового ряда, способы их получения и содержащие их лекарственные средства).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Алешин С.В.** Обзор современных требований к содержанию обязательных разделов нормативной документации для фармацевтических субстанций // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – № 4(9). – С. 202–205.

2. Амбросов И.В, **Алешин, С.В.**, Алимбарова Л.М., Матело С.К., Шохин И.Е. Использование органических соединений германия в медицине // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – № 2(11). – С. 144–150.

3. **Алешин С.В.**, Амбросов И.В., Матело С.К., Шохин И.Е. Разработка методики определения фрагмента ацикловира в составе инновационного лекарственного препарата ациклогерманий методом ВЭЖХ. Идентификация основной примеси // **Сорбционные и хроматографические процессы.** – 2016. – № 1(16). – С. 93–99.

4. **Алешин С.В.**, Гегечкори В.И., Амбросов И.В, Матело С.К., Шохин И.Е. Разработка методики количественного определения германия в лекарственных препаратах методом атомно-абсорбционной спектроскопии // **Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология.** – 2016. – № 1. – С. 126–130.

5. **Алешин С.В.** Стандартизация инновационного лекарственного препарата ациклогермания, краткий обзор // материалы сборника тезисов VII Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств». – г. Воронеж. – С. 188.

6. **Алешин С.В.**, Раменская Г.В., Кузина В.Н., Гегечкори В.И. Стандартизация нового лекарственного средства ациклогермания // Естественные и технические науки. – М., 2018. – №4 (118). – С. 19-22.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ – Государственная фармакопея

ИК – инфракрасный

МС – масс-селективный

УФ – ультрафиолетовый