

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

БРКИЧ ЛИЛИАНА ЛЮБАНОВНА

**РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
ХИТОЗАНСОДЕРЖАЩИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ**

14.04.01 Технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ
доктор фармацевтических наук,
профессор
Пятигорская Наталья Валерьевна

Москва 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Современные подходы к расширению номенклатуры лекарственных препаратов для лечения инфицированных ран различного генеза	12
1.2 Раневые покрытия с протеолитической активностью	14
1.3 Гидроколлоиды, гидрогели и пенные материалы в лечении ран и раневой инфекции	16
1.4 Гидрофобные и гидрофильные мази для купирования раневого процесса.....	17
1.5 Хитин. Получение хитозана. Структура и свойства	17
1.5.1 Степень дезацетилирования и молекулярная масса	18
1.5.2 Способность хитозана к комплексообразованию, используемая в качестве носителя лекарственных препаратов	20
1.5.3 Перспективы применения хитозана в медицине и в фармацевтической промышленности	22
1.6 Преимущества комбинированного лекарственного средства с комплексной терапевтической активностью для лечения инфицированных ран различного генеза.....	26
Выводы к главе 1	28
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
2.1 Объекты исследования: действующие и вспомогательные вещества	29
2.2 Методика определения подлинности химопсина по створаживающему действию на растворы молока.....	33
2.3 Методика определения протеолитической активности химопсина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий».....	33
2.4 Методика определения мирамистина методом ВЭЖХ	34
2.5 Методика определения лидокаина методом ВЭЖХ.....	35
2.6 Методика определения микробиологической чистоты	35
2.7 Методика определения реологических характеристик геля	36
2.8 Методика определения характеристик поверхности методом атомно-силовой микроскопии	37
Выводы к главе 2	38

ГЛАВА 3	РАЗРАБОТКА СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «ГЕЛЬ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ» ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, НА ОСНОВЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ КОМПЛЕКСА ХИТОЗАН-ХИМОПСИН И КОМПЛЕКСА ХИТОЗАН- МИРАМИСТИН	39
3.1	Разработка состава ГЛФ «Гель ранозаживляющий» для наружного применения	41
3.1.1	Фармацевтическая субстанция	41
3.1.2	Вспомогательные вещества. Требования к полимерной композиции	43
3.1.3	Теоретическое и экспериментальное обоснование выбора полимерной основы	44
3.1.4	Изучение реологических свойств компонентов основы и ГЛФ	49
3.1.5	Определение осмотической активности образцов геля.....	54
3.1.6	Изучение процесса набухания полимерных пленок в зависимости от состава в различных модельных средах.....	55
3.1.7	Исследование образцов методом атомно-силовой микроскопии.....	62
3.1.8	Определение протеолитической активности химопсина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий»	66
3.1.9	Определение антимикробной активности мирамистина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий»	67
3.2	Оценка показателей качества ГЛФ «Гель ранозаживляющий».....	69
3.3	Система упаковки (укупорки).....	71
	Выводы к главе 3	71
ГЛАВА 4	РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ «ГЕЛЬ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ» НА ОСНОВЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ КОМПЛЕКСА ХИТОЗАН – ХИМОПСИН И КОМПЛЕКСА ХИТОЗАН – МИРАМИСТИН.....	73
4.1.	Разработка технологии получения ГЛФ	73
4.2	Разработка аналитических методик определения показателей качества ГЛФ «Гель ранозаживляющий».....	103
4.2.1	Методика определения протеолитической активности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» .	103
4.2.2	Методика определения подлинности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» по химопсину.....	106
4.2.3	Методика количественного определения мирамистина методом ВЭЖХ	107

4.2.4 Методика количественного определения лидокаина методом ВЭЖХ в ГЛФ.....	114
4.2.5 Методика определения эффективной вязкости ГЛФ	120
4.3 Разработка проекта нормативной документации на ГЛФ «Гель ранозаживляющий».....	120
4.4 Исследование стабильности в процессе хранения ГЛФ «Гель ранозаживляющий»	123
Выводы к главе 4.....	130
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	131
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	134
ПРИЛОЖЕНИЕ А	148
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	154
ПРИЛОЖЕНИЕ В	156
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	157
ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	158
ПРИЛОЖЕНИЕ Е.....	172
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж	186
ПРИЛОЖЕНИЕ И.....	190

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Целью Стратегии национальной безопасности Российской Федерации, утвержденной Указом Президента Российской Федерации от 31.12.2015 г. № 683 «О Стратегии национальной безопасности Российской Федерации», «Стратегии инновационного развития Российской Федерации на период до 2020 года», утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 08.12.2011 г. № 2227-р, является переход к 2020 году экономики Российской Федерации на инновационный путь развития. Фармацевтическая и медицинская промышленность входят в 5 приоритетных направлений высокотехнологичного развития российской экономики, включая прикладную науку и инженерию. Задачей Государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 15.04.2014 № 305 является вывод на рынок инновационных лекарственных средств, выпускаемых отечественной фармацевтической промышленностью.

Лечение инфицированных ран остается важной проблемой в ежедневной хирургической практике. Одним из направлений поиска эффективного способа лечения таких ран является разработка комбинированных лекарственных препаратов мультифункционального действия для наружного применения, содержащих в своем составе несколько действующих веществ, обладающих комплексной терапевтической активностью в отношении основных субстратов сложной, длительно незаживающей раны.

Фармацевтическая композиция на основе двух инновационных хитозансодержащих субстанций: комплекс хитозан–химопсин и комплекс хитозан–мирамистин, для лечения инфицированных ран в лекарственной форме гель для наружного применения обладает четырьмя видами фармакологических эффектов – некролитическим, антимикробным, ранозаживляющим и обезболивающим. Комплекс хитозан–химопсин обеспечивает пролонгированное протеолитическое действие фермента, восстанавливает микроциркуляцию в стенках раны, улучшает обменные процессы и снимает местное воспаление. Комплекс хитозан–мирамистин обладает бактерицидным действием в отношении аэробных и анаэробных бактерий, грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, как в виде монокультур, так и в виде ассоциаций, включая госпитальные штаммы, обладающие полирезистентностью к антибиотикам.

Лекарственный препарат «Гель ранозаживляющий» обладает косвенным обезболивающим эффектом благодаря охлаждающему эффекту при апплицировании на поврежденную поверхность. В процессе патентного поиска было подтверждено, что не существует зарубежных и российских объектов техники аналогичных по составу разрабатываемым технологиям. Комбинированный лекарственный препарат на основе

хитозансодержащих фармацевтических субстанций обладает патентной чистотой и является патентоспособным в соответствии с имеющимся уровнем новизны и изобретательности, а его разработка является актуальной задачей фармацевтической науки.

Степень разработанности темы исследования

На основании изучения данных базы патентов Российской Федерации и зарубежных патентных ведомств, российской и иностранной научной литературы было установлено, что отсутствует информация о разработке состава и технологии получения инновационного комбинированного лекарственного препарата с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров, содержащего комплекс хитозан-химопсин и комплекс хитозан–мирамистин.

В Институте трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России был впервые разработан, теоретически и экспериментально обоснован рациональный состав и оптимальная технологическая схема получения лекарственного препарата на основе хитозансодержащих фармацевтические субстанции, ставших объектами настоящего исследования.

Цель исследования

Целью исследования является научно-обоснованная разработка состава и технологии получения, комбинированного лекарственного препарата для наружного применения на основе инновационных хитозансодержащих фармацевтических субстанций для лечения инфицированных ран различного генеза.

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

1. Провести сравнительный анализ современной номенклатуры средств, используемых для лечения инфицированных ран различного генеза.
2. Разработать и обосновать состав комбинированного лекарственного препарата для наружного применения на основе инновационных хитозансодержащих фармацевтических субстанций.
3. Разработать технологию получения лекарственного препарата для наружного применения «Гель ранозаживляющий».
4. Разработать методики контроля качества лекарственного препарата «Гель ранозаживляющий».
5. Провести исследование стабильности лекарственного препарата «Гель ранозаживляющий».

6. Разработать проект нормативной документации и опытно-промышленный регламент на лекарственный препарат для наружного применения «Гель ранозаживляющий».

Научная новизна

С использованием экспериментальных методов разработан инновационный комбинированный лекарственный препарат на основе комплекса хитозан–химопсин и комплекса хитозан–мирамистин, которые были впервые использованы в качестве фармацевтических субстанций для получения готовой лекарственной формы. Впервые проведена фармацевтическая разработка: выбран состав, разработана технология получения, разработаны методики анализа, изучена стабильность лекарственного препарата на основе инновационных субстанций в готовой лекарственной форме.

Научная новизна проведенных исследований подтверждена тремя патентами: Патент РФ № RU 2691144 С1. «Комбинированная композиция для лечения инфицированных ран различного генеза»; Патент РФ № RU 2687102 С1. «Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза»; Патент РФ № RU 2697869 С1. «Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза».

Теоретическая и практическая значимость исследований

В результате проведенных исследований обоснована перспективность использования инновационного комбинированного лекарственного препарата – «Гель ранозаживляющий» для наружного применения, содержащего в своем составе в качестве действующих веществ комплексы хитозан–химопсин и хитозан–мирамистин.

В результате проведенных исследований разработан состав и технология получения инновационного лекарственного препарата – гель для наружного применения. Проведена апробация технологии получения и методик контроля качества мягкой лекарственной формы на ООО «Тульская фармацевтическая фабрика». Результаты исследований вошли в комплексный отчет о проделанной работе в рамках Государственного контракта от 30.09.2016 г. № 14. N08.11.0113 по теме «Доклинические исследования лекарственного средства с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза».

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты исследований по выбору и обоснованию вспомогательных веществ для получения готовой лекарственной формы «Гель ранозаживляющий»;

- результаты исследования по определению пространства проектных параметров при разработке технологии получения готовой лекарственной формы для наружного применения;
- результаты по разработке методик контроля качества лекарственного препарата;
- результаты по разработке технологии получения лекарственного препарата;
- результаты изучения стабильности лекарственного препарата.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследований составили труды российских ученых в области разработки научных основ получения ЛС на основе высокомолекулярных соединений И.И. Краснюка, С.А. Кедика, Н.Б. Деминой, Н.Б. Бунятыян, А.И. Сливкина, М.В. Погорелова, Е.О. Медушевой, А.А. Белова, В.Л.Лапенко, О.А.Сафонова, С.Н.Суслиной и др.

В работе использованы фармакопейные методы, включенные в Государственную Фармакопею Российской Федерации, требования Приказа Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении правил надлежащей производственной практики», Решение Совета ЕЭК от 03 ноября 2016 года № 77 «Об утверждении правил Надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза», Решение Коллегии ЕЭК от 10.05.2018 № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций».

Также были учтены рекомендации, представленные в руководствах под редакцией В.В. Береговых: «Валидация аналитических методик для производителей лекарств. ВЭЖХ, ТСХ, титрование и ГЖХ. Обоснование референтных стандартов. Тесты пригодности системы, перенос методов, ревалидация» и «Валидация в производстве лекарственных средств».

Основными методами исследования, которые использованы в работе, являются: литературный поиск, контент-анализ, патентный поиск, статистические методы, методы технологического контроля, методы анализа лекарственных препаратов, фармацевтико-технологические испытания на лекарственные формы, методы планирования и проведения валидации.

Достоверность результатов научных положений и выводов

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.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы, достоверны и логично вытекают из полученных автором данных.

При проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование, методами статистической обработки установлена воспроизводимость и правильность результатов исследований, что позволяет считать их достоверными.

Апробация результатов исследования

Основные положения работы и результаты исследования доложены на конференциях: Biocatalysis-2017: Fundamentals & Applications (25-30 июня 2017г., Москва, Россия); Bionanotox 2017 – 8th International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues» (7-14 мая 2017 г., Ираклион, Греция); XIV Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии (30 октября – 2 ноября 2018 г., Москва); Конференция «Актуальные аспекты химической технологии биологически активных веществ» (25 мая 2018 г., Москва).

Апробация результатов диссертации состоялась на межкафедральной конференции кафедры фармацевтической технологии Института фармации, кафедры промышленной фармации Института профессионального образования и Центра фармацевтических технологий Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 10 от 06.06.2019 года.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в постановке задач и их реализации в экспериментальной части. Автором лично проведены исследования технологических характеристик инновационных фармацевтических субстанций, проведена разработка состава и технологии готовой лекарственной формы. Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе, получены автором самостоятельно и внедрены в практику.

Внедрение результатов исследования

Научно-практические результаты исследования – ОПР на производство (Акт внедрения № 35 от 18.12.2017 г.) и методики контроля качества (Акт внедрения № 17 от 23.09.2017 г.) на ЛП «Гель ранозаживляющий» внедрены в работу ООО «Гульская фармацевтическая фабрика»; результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре фармацевтической технологии Института фармации (Акт внедрения № 12 от 27.09.2019 г.); получены 3 патента РФ на изобретения.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 Технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 3 и 4 паспорта специальности «Технология получения лекарств».

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу» по Государственному контракту от 30.09.2016 г. № 14. N08.11.0113 на проведение прикладных научных исследований и экспериментальных разработок по теме «Доклинические исследования лекарственного средства с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза».

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени 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 01201261653).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауке России и 7 статей в журналах, индексируемых в международных базах, данных Scopus и Web of Science, 3 патента РФ на изобретения.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 190 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 27 таблицами, 25 рисунками и 3 формулами. Библиографический указатель включает 156 источников, из них 42 на иностранных языках.

В приложениях вынесены патенты, титульный лист опытно-промышленного регламента получения лекарственного препарата «Гель ранозаживляющий», Акт внедрения опытно-промышленного регламента получения лекарственного препарата «Гель ранозаживляющий»,

Акт внедрения методик контроля качества лекарственного препарата «Гель ранозаживляющий»,
Акт внедрения научных результатов в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии,
результаты изучения механизма действия лекарственного препарата, выдержка из отчета о
доклинических исследованиях лекарственного средства, проект нормативной документации на
лекарственный препарат «Гель ранозаживляющий», проект инструкции по медицинскому
применению на лекарственный препарат «Гель ранозаживляющий».

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные подходы к расширению номенклатуры лекарственных препаратов для лечения инфицированных ран различного генеза

Сложности в ранозаживлении остаются актуальной проблемой в хирургической практике [14, 17, 29]. Широкое распространение раневой патологии и связанные с ней осложнения, трудность своевременной диагностики, лечение и наносимый экономический ущерб перерастают в серьезную социальную проблему. Длительное лечение ран в стационаре и их амбулаторная реабилитация приводит к значительным материальным затратам, обуславливая тем самым значимость проблемы [14, 29, 37, 43].

Раневой процесс отличается строгой цикличностью, и каждый предыдущий этап является подготовительным для следующего [85, 111, 113]. В случае хронической открытой раны регенерация тканей замедляется, и повреждение не проявляет признаков заживления или проявляет их недостаточно, несмотря на сопутствующую терапию и время. При длительном неблагоприятном воздействии раневой процесс приобретает хроническое течение: диабетическая стопа, пролежни, венозные трофические язвы голени, ишемические язвы. Для подобных патологических состояний характерно наличие признаков сразу всех 3-х фаз раневого процесса, в связи с этим лечение хронических ран – крайне сложная клиническая проблема [5, 10, 63, 98, 112].

Принципы лечения ран зависят от процессов, происходящих в ране и от фазы, в которой начато лечение. Для улучшения результатов лечения гнойных ран дополнительно к хирургической обработке применяют местные ранозаживляющие средства [111, 102, 63, 33, 44, 18], которые представлены мазями на гидрофобной и гидрофильной основе, пленочными повязками, пенными материалами, гелями, а также традиционными перевязочными средствами на основе хлопковой целлюлозы [42, 73, 75, 99]. Применяемые методы лечения гнойной хирургической инфекции вообще и гнойных ран, в частности, не удовлетворяют современную практическую хирургию [14], о чем свидетельствует огромное количество публикаций, посвященных данной тематике [12, 33, 44, 73, 62].

В настоящее время широко используется сульфадiazин серебра, который применяется в качестве антимикробного препарата на первой и на последующих фазах лечения, ускоряет заживление пролежней, ран, трофических язв, ожогов. Также применяется сульфаниламид, который активен в отношении грамположительных и грамотрицательных кокков и способствует быстрому заживлению раны. Гидроксиметилхиноксалиндиоксид – как антибактериальное средство широкого спектра действия, способно обеспечить очищение раневой поверхности, стимулирует репаративную регенерацию, краевую эпителизацию, благоприятно влияет на

течение раневого процесса. Мупиноцин активен в отношении как грамположительных аэробных микроорганизмов, так и грамотрицательных микроорганизмов. Гентамицин – бактерицидный антибиотик широкого спектра действия, характеризуется пролонгированным антибактериальным действием. Эритромицин представляет собой антибактериальное средство, которое останавливает рост и развитие ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, и некоторых других микроорганизмов. Хлорамфеникол, являясь антибактериальным средством широкого спектра действия, эффективно воздействует на различные грамотрицательные и грамположительные микроорганизмы, в том числе и на возбудителей гнойной инфекции.

Мирамистин – бензилдиметил [3-(миристоиламино) пропил] аммоний хлорид моногидрат обладает широким спектром антимикробного действия, оказывает выраженное бактерицидное действие в отношении грамположительных, грамотрицательных, аэробных и анаэробных бактерий, определяемых в виде монокультур и микробных ассоциаций, включая госпитальные штаммы с полирезистентностью к антибиотикам, обладает противогрибковым действием также на патогенные грибы в виде монокультур и микробных ассоциаций, включая грибковую микрофлору с резистентностью к химиотерапевтическим препаратам [7].

Поливинокс способствует очищению ран, регенерации и эпителизации тканей. Диоксометилтетрагидропиримидин ускоряет регенерацию в ранах, нормализует обмен нуклеинов, ускоряет грануляционное созревание и рост ткани и эпителизацию, стимулирует лейкопоэз и эритропоэз, гуморальные и клеточные факторы иммунитета. Клостридиопептидаза, как фермент протеолитического действия, способствует очищению ран, предотвращает и развитие инфекции, ускоряет регенерацию.

Также для лечения в первой фазе применяются различные комбинации: комплекс диоксометилтетрагидропиримидина с хлорамфениколом, который оказывает противовоспалительное и противомикробное действие, комплекс, состоящий из хлорамфеникола и сульфадиметоксина, комплекс биена с гидроксиметилхиноксалиндиоксидом.

Во второй фазе рана характеризуется наличием серозного экссудата, отека и инфильтрации, поэтому нуждается в очищении от гнойно-некротического отделяемого. Лекарственные препараты (ЛП), на этом этапе, должны защищать грануляционную ткань от механического повреждения и действия других отрицательных факторов, подавлять в ране оставшиеся микроорганизмы [34, 85].

Повидон-йод является препаратом широкого спектра антимикробного действия. Механизм действия заключается во взаимодействии с белками клеточной стенки микроорганизмов с образованием йодаминов. Он активен в отношении грибов, вирусов, простейших [84]. Диэтилбензимидазолия трийодид оказывает непосредственное регенерационное действие на поврежденные кожные покровы, защищает поверхность раны от

инфекций, подавляет течение инфекционного процесса и способствует заживлению. Поморийского озера маточный щелок оказывает противовоспалительное и дезинфицирующее действие, угнетая патогенную бактериальную флору, стимулирует иммунобиологические защитные реакции – фагоцитоз и образование антител, стимулирует регенерацию тканей и эпителизацию раневых поверхностей. Также в этой фазе раневого процесса применяются диоксометилтетрагидропиримидин и диметилсульфоксид, которые оказывают местноанестезирующее, противовоспалительное, противомикробное (антисептическое) и фибринолитическое действие.

Третья фаза раневого процесса предполагает ее эпителизацию и реорганизацию рубца. В этой фазе используются стимуляторы репарации тканей [34, 85, 68, 36]. Гемодериват крови телят депротеинизированный активизирует обменные процессы тканей организма, регенерационные процессы и улучшает трофику. Декспантенол стимулирует регенерацию кожи.

Кроме того, успех лечения ран зависит не только от содержания в ЛП определенных действующих веществ, но и от правильно подобранной лекарственной формы.

1.2 Раневые покрытия с протеолитической активностью

В последние десятилетия в арсенале основных лечебных средств для купирования гнойно-некротических процессов стала применяться местная ферментотерапия [7, 44, 34, 85, 68, 45, 36]. Широко используется трипсин, который выпускается отечественной промышленностью и является ЛП. Такой выбор обусловлен несколькими причинами. Трипсин при попадании на гнойно-некротическую рану расщепляет нежизнеспособные ткани, которые обычно удаляются при хирургической обработке [107, 115, 117, 126, 130, 133, 137, 138].

В настоящее время в качестве носителей для иммобилизованных препаратов при лечении гнойно-некротических, ожоговых ран и трофических язв используются синтетические и природные полимеры [1, 4, 5, 7]. В качестве синтетических носителей используются различные полиамиды, полиэфиры, полипропилены и т.д.

Природные полимеры можно условно разделить на полисахариды, гетерогликаны (альгинаты, агар и агароза, пектины и каррагенаны), гликолипиды, протеогликаны [16, 15]. Целлюлозные носители БАВ являются наиболее эффективными, так как они обладают способностью очищать раневую поверхность, сорбируя продукты распада пораженных тканей [9, 10, 12].

Данные материалы пассивно участвуют в процессе очищения раны, обладают дренирующими свойствами, сохраняют оптимальный температурный режим в раневой среде, а также защищают рану от внешней контаминации [7, 60, 62, 63, 81, 89]. Благодаря образованию альдегидных групп при окислении целлюлозы увеличивается реакционная способность материала,

и интактный в химическом и биологическом отношении полисахарид превращается в носитель для иммобилизации.

Было установлено, что при совместной иммобилизации на полисахаридном носителе двух действующих веществ различных классов, эффективность их специфического действия взаимно усиливается. Это явление синергизма известно, как для веществ в нативном состоянии, так и для ковалентносвязанных с носителем лекарственных и биологически активных веществ [7, 9, 10, 27].

На отечественном рынке представлена целая линейка продукции, в которую входят раневые покрытия с трипсином и лизоцимом (ПАМ-ТЛ), только с трипсином (ПАМ-Т) и (Протеокс-Т), с трипсином и мексидолом (Протеокс-ТМ), с лизоамидазой (Лизоамид) и протеолитическим комплексом из гепатопанкреаса краба (Мультиферм) [13].

Практическая ценность указанных медицинских изделий выражается в высоком клиническом эффекте; пролонгированном действии (до 72 часов); уменьшении числа перевязок, что исключает травмирование грануляционной ткани, отсутствии побочных действий; избирательном действии только на патологический очаг; атравматичности, благодаря низкой адгезии; существенном уменьшении количества наносимых действующих веществ [17, 12, 60].

Большой интерес представляет применение протеолитического комплекса из *hepatopancreas* краба и его иммобилизация на нерастворимый носитель с целью получения медицинского изделия пролонгированного действия [11, 8, 16, 21, 42, 105, 126].

Коллективом ученых под руководством проф. В.Н. Филатова, разработано новое лечебное покрытие «Мультиферм» для лечения ран различной этиологии, трофических язв и пролежней. «Мультиферм» представляет собой многослойное раневое покрытие, состоящее из лечебного и впитывающего слоев. Лечебный слой – это модифицированная целлюлоза, обработанная хитозаном, к которой ковалентно присоединен протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба [150, 56, 118]. Многокомпонентный ферментный комплекс обеспечивает широкий спектр терапевтического действия.

Хитозан (Хт) в комбинации с ферментами обладает выраженным ранозаживляющим действием. Протеолитическая активность комплекса способствует очищению раневой поверхности от некротизированных тканей, эластолитическое и коллагенолитическое действие, оптимизирует процессы регенерации и препятствует формированию рубца. Впитывающий слой сорбирует раневое отделяемое и таким образом способствует понижению уровня микробной обсемененности в зоне раны.

1.3 Гидроколлоиды, гидрогели и пенные материалы в лечении ран и раневой инфекции

На российском рынке широко представлена продукция ранозаживляющих средств, состоящая из гидроколлоидных и гидрогелевых повязок на полимерной основе для непрерывного очищения и увлажнения раны на всех этапах заживления. Гидроколлоидные повязки состоят из коллоидов, способных к набуханию, которые заключены в самофиксирующийся эластомер, предназначены для лечения ран с участками «сухого» некроза. Повязки Branolind N фирмы Paul Hartmann на основе сетки, пропитанной мазевой основой, состоящей из вазелина, цетомакрогола, глицерина, триглицеридов, содержат перуанский бальзам и предназначены для лечения трофических и диабетических язв, пролежней и других длительно незаживающих ран.

Сетчатая повязка с серебром фирмы «Coloplast» обеспечивает локальное (вертикальное) впитывание, интенсивный дренаж раны и обладает противомикробными свойствами. Она также рекомендована для лечения гнойных ран. Повязки ВоскоПран с мазью левомеколь и ВоскоПран с диоксидином обладают длительным сорбирующим, антимикробным и иммуностимулирующим эффектом благодаря наличию метилурацила, диоксида и хлорамфеникола.

Созданы комбинированные ранозаживляющие средства нового поколения – гидроколлоидные препараты галагран (порошок), галактон (гель), и также препараты, содержащие пектин [45, 60, 77, 114].

Гидрогели –набухающие в воде трехмерные полимерные сетки, синтезированные на базе гидрофильных мономеров [102, 111]. Примером биополимерных композиций различного состава на основе альгината натрия является материал гидрогелевый «Колегель» с дезоксирибонуклеатом натрия (деринатом) и лидокаином. Аппликация Колетекс-АДН с деринатом с иммуностимулирующей активностью и Колетекс-СПФ с прополисом и фурагином обладают антиоксидантным, противовоспалительным и ранозаживляющим свойствами и предназначены для местной терапии длительно незаживающих ран и лучевых поражений при проведении лучевой терапии у онкологических больных [4, 22].

Медицинское изделие – гель «АППОЛО» предназначен для лечения ран различного происхождения, язв, пролежней. Основой изделия является гидрогель с введенными в его состав действующими веществами: антисептиком мирамистином и анестетиком анилокаином. Гель обладает обезболивающим эффектом в течение 1,5 часов после нанесения, предотвращает инфицирование раны [25, 26].

Сравнительно недавно появились исследования по изучению фармакологических эффектов применения спирулины и биологически активных соединений, выделенных из нее [82]. В частности, гель на основе спирулины, в состав которого входит настойка чистотела большого, обладает ранозаживляющим, противовоспалительным и антимикробным действием.

Раневое покрытие Коллахит (изделие медицинского назначения) содержит коллаген, Хт, а также антисептик – калия фурагин и анестетик – анилокаин [101, 78].

В работе Ю.Ю. Жидковой в качестве основных компонентов для разработки комбинированных средств, предотвращающих рубцевание ран, выбраны следующие действующие вещества: индуктор интерферона – циклоферон, анаболическое средство – глицин, противовоспалительное средство – глицирам и стимулятор репарации – масло шиповника [46].

1.4 Гидрофобные и гидрофильные мази для купирования раневого процесса

Особую нишу этой группы препаратов занимают мази на гидрофильной основе, которые широко применяются в клинической практике, как в стационаре, так и в амбулаторных условиях. Это ЛП на основе метилурацила (левомеколь, левосин), обладающие иммуностимулирующим и противовоспалительным действием, которые используются, как правило, во второй (стадии эпителизации) и третьей стадии (организации рубца) раневого процесса [17, 147]. Комбинированный препарат Левосин оказывает выраженное анальгезирующее, противовоспалительное, противомикробное и некролитическое действие. Препарат активен по отношению к анаэробам, грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам. Мазь с протеолитическими ферментами Ируксол в основном применяется для очищения трофических язв от некротизированных тканей. Основное действующее вещество мази Ируксол – фермент коллагеназа [85].

Эффективным ЛП для лечения ран является мазь Стелланин® - стимулятор регенерации тканей, антибактериальное и противовоспалительное средство, обладает обезболивающим и мощным ранозаживляющим действием. Активным действующим веществом препарата Стелланин является 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид. Механизм фармакологической активности препарата заключается в непосредственном регенеративном действии 1,3-диэтилбензимидазолия.

Мазь Банеоцин оказывает бактерицидное действие. Неомицин и бацитрацин, входящие в состав препарата, проявляют синергизм действия.

1.5 Хитин. Получение хитозана. Структура и свойства

Хитин является основой скелетной системы тканей в панцирях ракообразных, а также входит в состав клеточной стенки грибов и некоторых бактерий. В организмах ракообразных хитин присутствует в виде хитин-карбонатного комплекса, поэтому для выделения хитина из основных видов сырья (крабов, криля, омаров) проводят такие технологические операции, как деминерализация и депротеинизация, включающие в себя обработку измельченных панцирей

раствором соляной кислоты и едкого натра с последующей промывкой водой, удалением красящих пигментов с помощью отбеливающих реагентов и липофильных веществ, промывкой спиртом и эфиром [27].

Хт был впервые получен в 1859 году при обработке хитина горячим раствором натрия гидроксида [106, 38, 124, 24]. Реакция деацетилирования хитина с получением Хт представлена на рисунке 1.

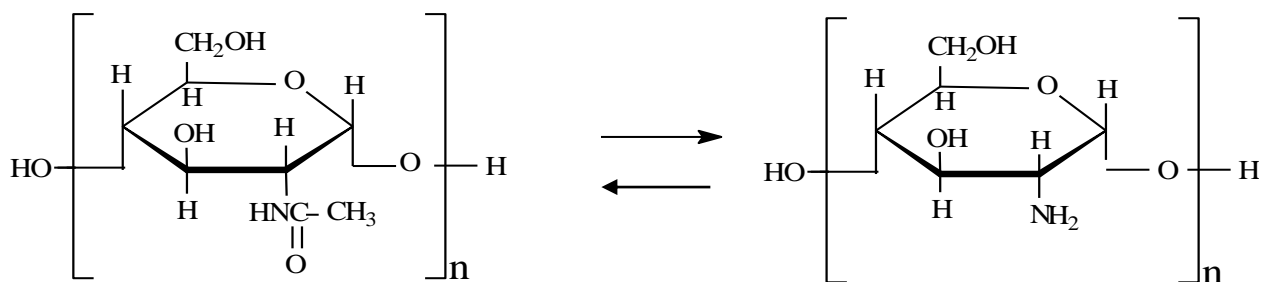


Рисунок 1 – Реакция деацетилирования хитина с получением Хт

Хт – деацетилированная форма хитина. Степень деацетилирования варьируют в зависимости от назначения полимера. Его свойства обеспечивают уникальные возможности для технологий контролируемого высвобождения действующих веществ. Хт может использоваться в микрогранулированных системах, матрицах с пролонгированным высвобождением, эродируемых матрицах, гелевых системах контролируемого высвобождения, носителях в системах, полученных влажным гранулированием [83, 106, 66, 24].

1.5.1 Степень деацетилирования и молекулярная масса

Полисахарид Хт широко доступен, нетоксичен, биосовместим и биodeградируем, используется для пролонгированной доставки действующих веществ [83].

Основные характеристики, влияющие на его свойства - это степень деацетилирования и его молекулярная масса, от которых напрямую зависят растворимость полимера, его реологические и физические свойства. Различные условия получения Хт, такие как тип и концентрация химических агентов, время, а также температура, при которой проводится процесс, значительно влияют на характеристики получаемого вещества.

При этом и степень деацетилирования, и молекулярная масса могут быть изменены, например, степень деацетилирования может быть уменьшена посредством реакции реацетилирования, а молекулярная масса может быть уменьшена за счет кислотного гидролиза [38, 155, 103].

Свойства растворов Хт зависят не только от общей степени деацетилирования, но и от распределения ацетильных групп в общей полимерной цепи [142], хорошо растворяется в разбавленных растворах органических кислот с образованием геля, чаще всего используется водный раствор уксусной кислоты. При этом существует зависимость вязкости получаемого геля от концентрации вещества. Появление свободной аминогруппы в элементарном звене макромолекулы Хт обуславливает проявление его свойств как полиэлектролита [142].

После деацетилирования он представляет собой набухшее вещество с содержанием воды 70%. Для предотвращения ороговения сушат при 50-55 °С [41]. Воздушно-сухой Хт содержит 8-10% воды. В процессе хранения на свету наблюдается его потемнение до коричневого цвета и уменьшение растворимости [24].

Было установлено, что состав (остаточное содержание кислоты растворителя, соотношение ацетамидных и аминогрупп), а также надмолекулярная и морфологическая структура пленок Хт зависят от условий удаления растворителя. При термообработке уксуснокислой формы протекает реакция амидирования и обогащение полимерных цепей хитиновыми фрагментами. Данный факт и зависимость глубины этого процесса от температуры (от комнатной до 120 °С) и продолжительности подтвержден с использованием методов ИК-спектроскопии, потенциометрического титрования и ЯМР.

При прогреве пленок в ИК-спектрах наблюдается уменьшение интенсивности поглощения карбоксилат-ионов и появление амидной полосы, данный процесс, по мнению авторов работы [50] может сопровождаться сшивкой полимера. Глубина протекания реакции амидирования в пленках коррелирует с показателями их растворимости, сорбции воды и хлористоводородной кислоты.

Благодаря своей химической природе Хт способен к различным видам взаимодействия с образованием 4-х основных типов связей: ионных, водородных, гидрофобных, связей по типу комплексообразования, в котором он выступает в роли комплексообразователя [39, 38]. Ионные взаимодействия осуществляются за счет аминной группы. Поликатионный характер данного полисахарида открывает широкие перспективы его использования. Абсолютное большинство поверхностей природных объектов заряжены отрицательно.

Поэтому, когда Хт в катионной форме добавляют к водным растворам (дисперсиям) минеральных, органических или живых объектов, в зависимости от концентрации происходит либо флокуляция, либо стабилизация частиц в водной среде. На этом механизме основано, в частности, выделение живых клеток из растворов методом концентрирования в присутствии Хт [39, 38, 70, 76].

1.5.2 Способность хитозана к комплексообразованию, используемая в качестве носителя лекарственных препаратов

Способность Хт к комплексообразованию обусловлена наличием неподеленных электронных пар у атома азота и, в ряде случаев, связи образуются за счет неподеленных пар атома кислорода. На этом принципе основано образование связей хелатного типа со многими металлами за исключением щелочных и щелочноземельных [39, 106, 66, 57, 38]. Хт также образует водородные и гидрофобные связи при взаимодействии с рядом органических веществ [39, 38, 124, 76]. Наличие в структурных звеньях двух гидроксильных и аминогруппы расширяет возможности его модификации. Особый интерес при синтезе производных Хт представляет получение замещенных соединений (синтез О- или N-производных) [39, 106, 65, 66, 57, 96].

В работе [55, 93] изложены способы иммобилизации антимикробных, противовоспалительных и ранозаживляющих препаратов на основе производных Хт, которые отличаясь низкой токсичностью сохраняют лечебные свойства с пролонгацией терапевтического действия.

В работе [80] приведен обзор литературы за период 2000-2004 гг. по способам получения и изучения медико-биологических свойств производных Хт, установлена антибактериальная, противовирусная, и противовоспалительная его активность и различных композиций на его основе при практически полном отсутствии токсического действия на организм. Достоверно подтверждено иммуностимулирующее, адьювантное, адаптогенное, гемостатическое и холестерическое действие данных гликанов [14, 94].

Предложены различные варианты ранозаживляющих средств на основе Хт. При этом учитывались свойства полимера подавлять фиброз, проявлять гемостатический эффект, расщепляться лизоцимом. Способность гликанов или их полимерных композиций формировать пленки была использована при изготовлении ранозаживляющих материалов при условии дополнительного импрегнирования в массу полимера ЛП, ферментов, метаболитов для ускорения регенерации кожного покрова; разработаны соответствующие жидкие и мазевые средства наружного применения. Показано ускорение эпителизации ран, процессов роста грануляций, интенсификация очищения раневых поверхностей [14, 108, 106, 65, 66, 57, 38].

Хт обладает радиопротекторными свойствами. Установлено, что для него характерна выраженная противолучевая активность, как в условиях профилактики, так и при лечении. Внутривенное его введение за 10-15 минут до облучения (365-385 рад), вызывающего костномозговую форму лучевой болезни, предотвращает гибель животных. При этом также изучен механизм действия монохлорацетата и ацетата Хт с мМ 70 кДа [2,38]. Проведены исследования по изучению влияния различных режимов термообработки на физические свойства [94, 19, 134].

Ряд исследований посвящено вопросу изучения антибактериальной активности Хт в зависимости от молекулярной массы и степени деацетилирования [108, 106, 65, 66, 57, 96, 93]. Аминоглюканы со значительной степенью полимеризации в виде 1,0% растворов в 0,2% хлористоводородной кислоте проявляют антимикробное действие в отношении многих микроорганизмов [94, 109]. Под действием Хт усиливается проницаемость наружной мембраны клеток до пределов их жизнеспособности. Эффективность действия Хт возрастает с увеличением степени деацетилирования и его концентрации. Клетки *E.Coli* в условиях воздействия аминоглюкана деформируются и подвергаются аутолизу [94, 19, 96, 125]. Препараты на основе хитина и Хт оказывают защитное действие при бактериальной септической инфекции (выживаемость достигает 90%).

Установлена способность Хт ингибировать вирусные инфекции в клетках животных организмов, а также предотвращать развитие фаговых инфекций в зараженной культуре микроорганизмов [106, 66, 96]. Противовирусная активность, как и его антибактериальные свойства, существенно зависят от степени полимеризации и от величины положительного заряда на макромолекулах. В животных организмах влияние на вирусные инфекции объясняется его воздействием на индуктивную фазу иммунной системы. Важную роль играет способность индуцировать в живом организме образование интерферона [110, 49].

Разработаны лечебно-косметические кремы на основе гидрогелей Хт [96]. При нанесении геля на раневую поверхность кожи образующаяся пленка ускоряет процесс заживления в 8 раз за счет активации биологического очищения раны и ингибирования инфекционного процесса. Изучена кинетика высвобождения Хт в коже при различной глубине ее поражения. В течение 24 часов он проникает в глубокие слои эпидермиса и дермы, постепенно связываясь во всех слоях кожи, в частности с коллагеновыми волокнами дермы [94, 19, 96, 65].

Хт может быть использован в виде комплекса с ЛП в качестве носителя, обеспечивающего замедленное высвобождение действующего вещества. Комплекс модифицированного Хт применяют в качестве системы доставки в таблетках, пленках, порошках, матричных системах и в качестве покрытий или пленок на имплантатах. Для получения ЛП используют структурированный Хт [94, 19, 96, 144].

Отмечено бактерицидное и антиоксидантное действие водорастворимого Хт с молекулярной массой 5-200 кДа при варьировании концентрации полимера и молекулярной массы в действии на различные микроорганизмы; установлены минимальные подавляющие концентрации. Найдено, что наиболее сильным антиоксидантом был Хт с молекулярной массой около 92 кДа. Гидрофильные хитозаны были предложены в качестве консервантов и антиоксидантов в косметических препаратах [96].

На основе производных Хт предложена интерполиэлектролитная система с контролируемым выделением антиоксиданта в среду [96, 79].

Полимерные композиции в качестве средств для заживления ран, полученные на основе Хт и окисленного полисахарида (арабиногалактан, декстран, желатин, амилоза), применяют в виде сшитых гелей, микросфер, губок, пленок. Окисленный полисахарид со степенью окисления 5-50% может быть сшит полиамином (гидролизированным протеином, поливиниламином) [96].

В Хт могут быть иммобилизованы различные классы веществ, такие как клетки, биологически активные вещества (в том числе ферменты, ингибиторы, гормоны, антиблостомогенные вещества) и многие другие без значительной потери их биологических свойств [108, 106, 64].

Хт является прекрасным носителем для иммобилизации ферментов, так как обладает высокой химической и биологической стойкостью и механической прочностью, достаточной проницаемостью для самого фермента и субстратов, характеризуется высокой гидрофильностью и малой растворимостью, легко активируется для ковалентного связывания с ферментом [64].

Хт в виде растворов, гелей или пленок используется для лечения ран, ожогов и других травматических повреждений кожи. Искусственная кожа – пленка, изготовленная на основе Хт, не вызывает реакции отторжения, нанесенная на ожоговые поверхности, легко срастается с тканями и поэтому нет необходимости удалять ее, так как является питательной средой для роста собственных клеток кожи.

1.5.3 Перспективы применения хитозана в медицине и в фармацевтической промышленности

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о перспективности использования Хт и его производных в медицине, биотехнологии, фармацевтике, пищевой промышленности [39, 106, 57, 38, 64, 71].

Ведущую роль в мире по исследованию Хт и хитина, производству данных полисахаридов занимает Япония. Именно в Японии в 1972 году впервые в мире начато промышленное производство, которое к настоящему времени превышает 2000 тонн в год. В США выпускается свыше 700 тонн в год, и, по мнению американских экспертов, называющих «полимером XXI века», мировой рынок продукции на его основе в данном столетии будет носить глобальный характер. Основным потребителем является здравоохранение, на долю которого приходится до 65% производимого Хт. Далее следует сельское хозяйство (12%), утилизация отходов и очистка сточных вод (7%), пищевая промышленность (5%), косметическая промышленность (5%) [39, 38, 30, 23, 28, 91, 152].

Весьма полезными свойствами Хт при использовании его в пищевых целях являются его сорбционные свойства и способность восстанавливать микробную флору кишечника. Первичные аминогруппы Хт или его комплексов обеспечивают связывание ионов тяжелых металлов и радионуклидов, в десятки раз превосходя по эффективности ионнообменные смолы [100]. Его способность образовывать полиэлектролитные комплексы с анионными полимерами может использоваться для связывания и выведения из организма различных токсинов.

Механизм действия Хт на патогенную микробную флору предположительно связывают с нарушением этим адсорбентом целостности наружной микробной мембраны, в состав которой входят липополисахариды, гликопротеиды и фосфолипиды. Нарушение защитной микробной оболочки способствует большей уязвимости микроорганизма и повышению его чувствительности к антибиотикам.

Так, адсорбент на основе сшитого гранулированного Хт с иммобилизованным полимиксином В, практически не влияет на скорость роста микробных колоний, однако повышает доступность практически всех антибактериальных препаратов к синегнойной палочке и другим патогенным микроорганизмам, способствуя тем самым их лизису.

Установлено, что Хт может вызвать апоптоз 5-фторурацил некоторых видов раковых клеток [143]. Получен 5-фторурацил Хт, обладающий противоопухолевой активностью, который селективно проникает в опухолевые клетки и ингибирует их рост без побочных эффектов, с пролонгированной активностью [76]. Исследование механизмов стимулирующего эффекта Хт, по мнению авторов работы [92], показало, что выраженный общеклинический эффект препарата может быть в большей степени обусловлен активизацией фагоцитарной активности макрофагов. Именно этот механизм обеспечивает запуск целого ряда каскадных реакций, отвечающих за скорость формирования и выраженность специфического гуморального иммунитета [58].

В литературе имеются сведения об активации образования препаратами хитина и Хт ряда цитокинов [149]. В онкологии Хт применяется для транспортировки действующих веществ, в основном цитостатиков, например, 5-фторурацила. При этом биопереработанный хитозан способен селективно накапливаться вокруг раковых клеток и ингибировать их рост. Для торможения опухолевого роста с успехом применяли водорастворимые конъюгаты митомицина С с препаратами Хт [148].

Также изучали возможность применения 6-О-сульфат-хитина с высокой степенью сульфатирования и содержанием карбоксиметильных групп (SCM-химически модифицированный гепариноидный хитин) в онкологической практике [140]. Интересна также публикация испанских ученых, которые предлагают использовать хитозановые носители для доставки доксорубина при терапии рака [129]. N-Карбоксиметилхитозан-N, O-сульфат тормозит развитие вируса человеческого иммунодефицита типа 1 (HIV-1) в человеческих CD4+

-клетках и также вируса мышинной лейкемии, вызванной вирусом (RLV) Rausher в мышинных фибробластах [151].

Хт в виде губки оказался эффективным стимулятором остеогенеза, что показано при моделировании костного дефекта нижней челюсти у кроликов [54]. Исследование механизмов стимулирующего эффекта Хт показало, что в основе его лежит активация фазы биологического очищения раны. Это объясняется прежде всего повышением функциональной активности фагоцитов: ускорением миграции фагоцитов в рану (очаг воспаления), а также усилением фагоцитарной активности макрофагов вследствие увеличения положительного заряда их поверхностной мембраны и активации механизмов кислородзависимой бактерицидности [48,131].

В настоящее время уже начаты работы по получению полимерных носителей на основе Хт для противотуберкулезных ЛП. Были получены микросферы из природных полисахаридов Хт и альгината. Хт является поликатионом, а альгинат – полианионом. ЛП противотуберкулезные, которые вводились в микросферы – это рифампицин, изониазид и пипразинамид. Размер микросфер 65-75 мкм, и ЛП включается внутрь хитозан-альгинатных микросфер в меньших количествах (по сравнению с альгинатными микросферами) [145].

Свойства полиионного комплекса между Хт и альгинатом сильно зависят от среды раствора: уменьшение рН приводит к сжатию альгинатного геля и уменьшению проникающей способности альгинат-хитозанных микросфер. В нейтральной или щелочной среде интерполимерный комплекс набухает, и ЛП высвобождается. Преимуществом таких микросфер в сравнении с альгинатными в том, что Хт стабилизирует альгинатные микросферы, предотвращая их разрушение, увеличивает пористость микросфер и время высвобождения ЛП.

Способность Хт регулировать связывание с кишечником способствует высвобождению инкапсулированного ЛП. Его концентрация в пораженных органах (легкие, печень, селезенка) оставалась постоянной в течение недели, при введении чистого ЛП оно расходовалось за сутки; максимального значения концентрация достигала через сутки в случае микросфер и через час – в противном. Микросферы на основе Хт рассматриваются как перспективные носители лекарств как для парентеральной (минуя желудочно-кишечный тракт), так и для оральной доставки [135]. Польским учеными предложено использование микрокристаллического Хт в виде гидрогелевых частиц в качестве эффективного средства пролонгированной доставки кетопрофена [119].

В Японии разработаны хитозановые капсулы, содержащие противовоспалительный ЛП 5-аминосалициловую кислоту, для лечения колитов в модели на крысах [154]. Параллельно несколько лабораторий занимаются разработкой хитозановых микрокапсул с инкапсулированным в них инсулином для перорального применения [146, 153].

Наряду с низкой токсичностью, био- и гемосовместимостью, биоразрушаемостью пористая структура этих изделий играет очень важную роль. Этим объясняются атравматичные свойства хитозансодержащих лечебных материалов при лечении ран различной этиологии [48] как и проведенные исследования авторов работы [81] подтверждают эффективность применения препаратов Хт. Анализ результатов, полученных при изучении влияния нескольких лекарственных форм Хт (раствор, гель, пленка) на процесс заживления кожной раны у крыс и кроликов, показал, что применение геля обеспечивает достоверное ускорение процессов восстановления кожи [87].

Исследование механизмов стимулирующего эффекта Хт показало, что в его основе лежит активация фазы биологического очищения раны. Это объясняется, прежде всего, повышением функциональной активности фагоцитов: ускорением миграции фагоцитов в рану (очаг воспаления), а также усилением фагоцитарной активности макрофагов вследствие увеличения положительного заряда их поверхностной мембраны и активации механизмов кислородзависимой бактерицидности [156, 126, 136].

Как у нас в стране, так и за рубежом создаются разнообразные перевязочные средства на основе Хт и его производных [16, 133, 136]. Как уже изложено выше, сам Хт, (а вернее продукты его деградации в ране за счет эндогенных ферментов) обладает мощным ранозаживляющим действием [51, 68, 69, 74, 75]. И как следует из данных [80] Хт 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 Хт активен в кислой среде, характерной для начальных этапов любого раневого процесса, что для антибиотиков и раствора фурацилина было характерно в меньшей степени [50].

Низкая токсичность Хт и его производных, совместимость с тканями живых организмов и биodeградируемость делают его перспективным в качестве носителя ферментных и различных ЛП с целью пролонгирования их действия и контролируемого высвобождения [60].

Хт с успехом используется в фармацевтической промышленности и применяется для повышения скорости растворения плохо растворимых действующих веществ, например, гризеофульвина, преднизолона и других.

Совместное измельчение этих препаратов дает возможность резко, в десятки раз, повысить скорость растворения ЛП в водном растворе хлористоводородной кислоты, имитирующей среду желудка. При этом повышается и степень всасывания действующего вещества.

Производные хитина добавляют к фармакологическим средствам с целью регулирования высвобождения действующих веществ и создания препаратов пролонгированного действия:

аспирина, индометацина, папаверина гидрохлорида, тестостерона и др. При этом наблюдается замедленное высвобождение действующих веществ, что объясняется гелеобразующими свойствами Хт.

В кислой среде хитозансодержащие лекарственные формы набухают и плавают на поверхности. Благодаря этому можно избежать повреждения слизистой оболочки желудка при использовании таких лекарств, как аспирин и индометацин.

Описанные выше особенности строения и свойства Хт а, а также его производных свидетельствуют о практическом значении данного полимера, а широкое распространение в природе позволяет рассчитывать на значительную сырьевую базу промышленного значения для создания на его основе различных ЛП, медицинских и косметологических изделий [7].

Таким образом, Хт обладает противовоспалительным, антибактериальным, иммуностимулирующим и сорбирующим действием, поэтому создание новых ЛП на его основе, обладающих ранозаживляющим действием, является перспективным.

1.6 Преимущества комбинированного лекарственного средства с комплексной терапевтической активностью для лечения инфицированных ран различного генеза

Одно из направлений современной фармации – концепция «многофункциональных лекарств». Лекарственным средствам, действующим на одну, строго определённую мишень, противопоставлена широта фармакологического действия и способность нескольких действующих веществ взаимодействовать одновременно с разными мишенями.

Для монопрепаратов для лечения ран характерно однонаправленное действие (например, только антимикробное или противовоспалительное, или дегидратирующее и т.д.). Преимуществом комбинированных препаратов является возможность одновременного воздействия на разные звенья раневого процесса.

Поскольку в настоящее время показано, что процесс репарации раны является ферментативным с необходимым присутствием влажной среды, актуальна разработка неадгезивных полимерных гелевых покрытий с иммобилизованными протеолитическими ферментами. Последние способны размягчать и лизировать некротические образования, обладают антимикробной активностью и охлаждающим действием, хорошо моделируются и не травмируют рану, позволяют визуально контролировать ее состояние. Представляет интерес использование протеолитических ферментов химотрипсина и трипсина, которые повышают эффективность терапии за счет усиления лечебного действия благодаря более быстрому и полному гидролизу пептидных связей.

Разрабатываемое лекарственное средство для лечения инфицированных ран представляет собой гелевую композицию с инновационными комплексами протеолитического и антимикробного действия на основе Хт.

Целесообразность выбора гелевых основ для лечения раневых процессов объясняется тем, что они оказывают мягкое воздействие на рану, обладают обезболивающим эффектом благодаря охлаждению, не являются питательной средой для микроорганизмов, хорошо впитываются.

Механизм действия, разрабатываемого ЛП многофункционален и включает следующие терапевтические эффекты: ферментативное очищение раны за счет лизиса денатурированных белков без повреждения здоровых тканей благодаря комплексу хитозан – химопсин, антимикробное действие комплекса хитозан– мирамистин, а также снятие болевого синдрома за счет включения в состав разрабатываемого средства лидокаина.

Указанная комбинация биологически активных соединений обеспечивает эффект синергизма, выражающийся в сокращении времени очищения и полного заживления раны.

Учитывая особенности введения, к предлагаемому комплексу предъявляются следующие требования: биосовместимость с тканями человека, отсутствие аллергических реакций, пирогенного и токсического действия на здоровые ткани.

Действующим веществом, обладающим антимикробным действием и являющимся составной частью антимикробного комплекса с хитозаном является мирамистин – бензилдиметил [3-(миристоиламино) пропил] аммоний хлорид моногидрат.

Мирамистин обладает выраженным бактерицидным действием в отношении аэробных и анаэробных бактерий, грамположительных (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracoides*) и грамотрицательных организмов (*Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella*), как в виде монокультур, так и в виде ассоциаций (синегнойная палочка и стафилококк, эшерихии и стафилококки), включая госпитальные штаммы, обладающие полирезистентностью к антибиотикам.

Использование полисахаридного комплекса хитозана с мирамистином позволяет обеспечить пролонгированное антимикробное и фунгицидное действие, усилить функциональную активность иммунных клеток, при стимуляции местного (неспецифического) иммунитета [72]. Комплекс мирамистина с хитозаном ускоряет процесс заживления ран, обеспечивает снижение резистентности патогенных микроорганизмов к антибактериальной терапии, а также активацию защитных реакций в месте применения, за счет активации поглотительной и переваривающей функции фагоцитов [72].

Разрабатываемый ЛП предназначен для ускоренного заживления сложных инфицированных ран различной этиологии, в том числе и на фоне трофических нарушений.

При аппликации геля на рану происходит контакт действующих веществ с раневой поверхностью, что приводит к впитыванию раневого отделяемого, действию лекарственных препаратов на соответствующие субстраты раны и активизации процессов очищения и заживления раневого дефекта.

Выводы к главе 1

1. Проведенный информационно-аналитический анализ позволил установить, что в настоящее время отсутствуют комбинированные ЛП, на основе хитозансодержащих фармацевтических субстанций для лечения осложненной инфицированной раны, которые бы обеспечивали терапевтическое действие на соответствующие фазы раневого процесса, и обладали гидрофильностью для повышения биодоступности.

2. Разработка инновационных ЛП мультифункционального действия для наружного применения (гелей), содержащих в своем составе действующие вещества, обладающие комплексной терапевтической активностью в отношении основных патофизиологических процессов сложной длительно незаживающей раны, в частности, способных очистить раневую поверхность от гнойно-некротических масс, обеспечить антимикробное действие, снизить болевой синдром и, в конечном итоге, осуществить заживление раны в короткие сроки, является актуальной задачей современной фармации, обусловленной потребностями практического здравоохранения.

3. Фармацевтические субстанции на основе Хт, входящие в состав ЛП в качестве действующих веществ, являются оригинальными по составу. В доступных патентных и литературных источниках не найдены данные по получению других подобных композиций с протеолитическим ферментом химопсином и антимикробным препаратом мирамистином на основе производных глюкозамина.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования: действующие и вспомогательные вещества

Объектами исследования являлись фармацевтические субстанции комплекс хитозан – химопсин и комплекс хитозан–мирамистин, разработанные в Центре фармацевтических технологий Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Фармацевтическая субстанция комплекс хитозан – химопсин

Комплекс хитозан-химопсин представляет собой комбинированную фармацевтическую субстанцию ферментного препарата протеолитического действия – химопсина и высокомолекулярного полисахарида природного происхождения – хитозана кислоторастворимого. Активным действующим веществом комплекса является ферментный препарат химопсин, который обеспечивает ферментативное очищение раны от гнойно-некротических масс за счет лизиса денатурированных белков.

Группировочное название - комплекс хитозан – химопсин

Химическое название – в связи с тем, что данная фармацевтическая субстанция представляет комплекс, внутри которого отсутствуют химические взаимодействия, химическое название отсутствует.

Описание Лиофилизированная масса в виде порошка белого или светло-желтого цвета со слабым запахом уксусной кислоты, гигроскопичная.

Растворимость Растворима в воде, в 96% спирте, в хлороформе

Подлинность

Химопсин. А. Протеолитическая активность (спектрофотометрическим методом одновременно с количественным определением: субстанция должна обладать протеолитической активностью, Б. Качественная реакция на химопсин: субстанция должна обладать способностью створаживать молоко

Хитозан. Качественная реакция: окрашивание субстанции смесью йода с калия иодидом сначала в коричневый цвет, а при подкислении серной кислотой в красно-коричневый

pH От 5,0 до 5,1 (1% водный раствор)

Вода Не более 7,0%

Микробиологическая чистота Категория 3.2Б

Количественное определение

Протеолитическая активность Не менее (2,0 ± 0,5) ПЕ на 1 мг химопсина

Общий белок. Метод Лоури-Гартли, колориметрический. Содержание химопсина в субстанции должно быть не менее (120,0 ± 5,0) мг/г субстанции безводной

Хранение В сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности 2 года

Фармакологические свойства: компоненты химопсина расщепляют различные пептидные связи в белковой молекуле: трипсин гидролизует пептидные связи, содержащие остатки аргинина и лизина; химотрипсин расщепляет пептидные связи с остатками ароматических аминокислот - тирозина и триптофана. Химопсин восстанавливает микроциркуляцию в стенках раны, улучшает обменные процессы, что клинически проявляется уменьшением местного воспаления [14].

Хт является носителем ферментного комплекса, обеспечивает пролонгированное терапевтическое действие фермента, оказывает ранозаживляющее действие. Использование комплекса хитозан-химопсин обеспечивает ферментативное очищение раны от гнойно-некротических масс за счет лизиса денатурированных белков.

К качественным реакциям, устанавливающим подлинность по химопсину, относится определение створаживающей способности, к количественному определению относится определение протеолитической активности и определение количества белка по методу Лоури-Гартли.

Фармацевтическая субстанция комплекс хитозан –мирамистин

Комплекс хитозан-мирамистин представляет собой фармацевтическую субстанцию, содержащую в качестве активного вещества антибактериальный препарат мирамистин, который оказывает пролонгированное бактерицидное и фунгицидное действие, усиливает функциональную активность иммунных клеток и ускоряет процесс заживления ран [72]. Ферментный комплекс химопсин и антибактериальный препарат мирамистин иммобилизованы в структуру Хт за счет образования водородных связей и сил Ван-дер-Ваальса.

Группировочное название – комплекс хитозан – мирамистин.

Химическое название – в связи с тем, что между компонентами комплекса нет химического взаимодействия, химическое название отсутствует.

Описание Лиофилизированная губчатая масса белого цвета, со слабым запахом уксусной кислоты, гигроскопичная

Растворимость Растворима в воде, в 96% спирте, в хлороформе

Подлинность

Мирамистин. Качественная реакция: УФ-спектр 0,06% водного раствора испытуемого вещества в области от 240 до 280 нм в кювете толщиной 10 нм должен иметь:

-максимумы при длинах волн (257 ± 2) нм, (262 ± 2) нм, (268 ± 2) нм;

-минимумы при длинах волн (259 ± 2) нм, (266 ± 2) нм;

-плечо при длинах волн от (252 ± 2) нм до (254 ± 2) нм

Хитозан. Качественная реакция: окрашивание субстанции смесью йода с калия иодидом сначала в коричневый цвет, а при подкислении серной кислотой в красно-коричневый

pH От 5,1 до 5,3 (1% водный раствор)

Вода Не более 7,0%

Остаточные органические растворители Содержание ацетона должно быть не более 0,5%

Микробиологическая чистота Категория 1.2Б

Количественное определение Кислотное титрование в неводной среде Мирамистина – C₂₆H₄₇ClN₂O должно быть не менее 35,0 мг/г в пересчете на безводное и свободное от органического растворителя вещество

Хранение В сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности 2 года

Фармакологические свойства: Мирамистин в составе комплекса обеспечивает антимикробное и фунгицидное действие, усиливает функциональную активность иммунных клеток, при стимуляции местного неспецифического иммунитета, ускоряет процесс заживления ран, обеспечивает снижение резистентности патогенных микроорганизмов к антибактериальной терапии, а также активацию защитных реакций в месте применения за счет активации поглотительной и переваривающей функции фагоцитов [72].

Не повреждает грануляции и жизнеспособные клетки кожи, не угнетает краевую эпителизацию, не обладает местно-раздражающим действием.

Лидокаина гидрохлорид («Дж. Амфрейлабораториз» Индия, РУ№ЛСР-008000/10) был использован в качестве местного анестетика, который применяется для проводниковой, инфильтрационной, терминальной анестезии.

Механизм местноанестезирующего действия проявляется в угнетении нервной проводимости за счет блокады каналов натрия в нервных волокнах и окончаниях. Брутто формула: C₁₄H₂₂N₂O · HCl · H₂O, М. м. 288,81

Лидокаин представляет собой белый или почти белый кристаллический порошок, плохо растворим в воде. Используется в виде солянокислой соли, легко растворимой в воде.

Гидроксипропилметилцеллюлоза (Methocel K4M Premium CR, ID34680, производства Colorcon Limited, England) - кристаллический порошок белого цвета, без запаха. Вязкость 2% водного раствора – от 2,66 до 4,97. Потеря в массе при высушивании – 2–5%, pH 2,0% водного раствора – 5,0-8,0. Гидроксипропилметилцеллюлоза инертна к большинству активных и вспомогательных веществ, обладает хорошей текучестью, растворима в воде в любых пропорциях с образованием прозрачной жидкости различной вязкости, в зависимости от типа,

может растворяться в некоторых органических растворителях, например, в смеси этанола и метилхлорида.

При увеличении температуры или скорости перемешивания, вязкость обратимо уменьшается. В готовых лекарственных формах (ГЛФ) применяется в качестве солюбилизатора, эмульгатора, пленкообразователя, стабилизатора, суспенгатора, связывающего вещества, загустителя, матрицеобразователя.

Полиакриламид для медицинского применения (НТФ «Атомбиотех») - полимер белого цвета без запаха; растворим в воде, формамиде, ледяной уксусной и молочной кислотах, глицерине, набухает в пропионовой кислоте, пропиленгликоле, диэтилсульфоксиде, нерастворим в метаноле, этаноле, ацетоне, гексане. $T_{\text{стекл}} \approx 200 \text{ }^\circ\text{C}$, молярная масса достигает $\approx 1 \cdot 10^6$.

Наличие в полимере карбоксильных групп, в результате омыления амидных, оказывает большое влияние на вязкость полиакриамида, так как изменение вязкости с разбавлением будет носить «полиэлектrolитный характер».

Использовали кристаллический порошок белого цвета с желтоватым оттенком, без запаха. Потеря в массе при высушивании не более 7,0%. рН 1,0% водного раствора – 7,0-9,0.

Глицерин (ЗАО «Аист», Россия) содержит не менее 98,0 и не более 101,0 % пропан-1,2,3-триола в расчете на безводную субстанцию ОФС.1.3.0001.15. Представляет собой прозрачную, бесцветную, очень густую, вязкую, сиропобразную, тяжелее воды и неядовитую сладковатую на вкус жидкость, без запаха. Глицерин обладает способностью поглощать влагу из воздуха и удерживать ее. На воздухе может впитать до 50% воды. Удельный вес химически чистого глицерина при 15 °С составляет 1,26469. Молекулярная масса 92,09 г/моль [35].

При обычном атмосферном давлении глицерин кипит при 290 °С и частично разлагается, при пониженном давлении его можно перегнать, не разложив. Смешивается с водой, спиртом 96%. Мало растворим в ацетоне, практически нерастворим в эфире. Плотность 1,261 г/см при 20 °С.

Глицерин при производстве ЛП используется как консервант, растворитель, увлажнитель, пластификатор, растворитель, корригент вкуса. Относится к группе стабилизаторов, обладающих свойствами сохранять и увеличивать степень вязкости. При помощи глицерина смешиваются различные несмешиваемые смеси.

Вода очищенная (Система водоподготовки KLS 8/60, KLS 12/60, Германия).

Бесцветная прозрачная жидкость без запаха и вкуса, рН от 5,0 до 7,0. В воде очищенной нормируется содержание микроорганизмов – не более 100 в 1 мл при отсутствии бактерий семейства Enterobacteriaceae, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa.

Все остальные реактивы, если не оговорено особо, отечественного производства, квалификации не ниже «ХЧ».

2.2 Методика определения подлинности химопсина по створаживающему действию на растворы молока

Метод основан на способности химопсина створаживать молоко. Определение створаживающей активности проводили в водяном термостате с прозрачными стенками из стекла или плексигласа.

Основное оборудование: Термостат с прозрачными стенками ТПС.

Створаживающая активность выражается временем, прошедшим с момента добавления испытуемого раствора до появления первых признаков створаживания молока.

Требуемое значение показателя качества: Время створаживания химопсина для ГЛФ должно быть не более 50 сек.

2.3 Методика определения протеолитической активности химопсина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

Метод основан на определении количества тирозина, освобождаемого химопсином из казеина. За единицу протеолитической активности (ПЕ) принимают такое количество химопсина, которое за 1 мин при температуре 37 °С катализирует переход в неосаждаемое 10% трихлоруксусной кислотой состояние такое количество казеина, которое соответствует 1 мкМоль тирозина.

Основное оборудование:

1. UV-Vis- спектрофотометр Shimadzu UV-2600 с термостатируемой кинетической ячейкой (ТСС-240А).

2. ИК-Фурье спектрометр Nicolet 380 с приставкой НПВО (Thermo Scientific, США).

Протеолитическую активность X вычисляют по формуле (1):

$$X = \frac{(A_1 - A_2) \times V \times V_1}{a \times K_T \times V_0 \times t} \text{ (ПЕ)}, \quad (1)$$

где A_1 - оптическая плотность испытуемого раствора при 280 нм;

A_2 – оптическая плотность контрольного раствора при 280 нм;

V_1 – объем испытуемого раствора, мл;

V – объем реакционной смеси в пробирке, мл;

V_0 – объем аналитической пробы испытуемого раствора, мл;

a – навеска геля, в мг;

K_T – тирозиновый коэффициент – 1,20;

t – время реакции, мин;

Требуемое значение показателя качества. Протеолитическая активность химопсина в ГЛФ должна быть не меньше $(2,0 \pm 0,5)$ ПЕ/г геля.

2.4 Методика определения мирамистина методом ВЭЖХ

Настоящая методика устанавливает требования к контролю качества образцов ГЛФ на подлинность и количественное содержание мирамистина. Определение проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с требованиями ОФС 1.2.1.2.0005.15 [35].

Основное оборудование: Хроматограф жидкостной Agilent, снабженный УФ–детектором (MWD, зав. № DE64256455; DAD, зав. № DE64262550); колонка из нержавеющей стали размером 150 мм x 4,6 мм, заполненная сорбентом C18 (Zorbax Eclipse XDB-C18, «Agilent», США), с размером частиц 5 мкм.

Перед началом определения хроматографическую колонку в течение нескольких часов промывают смесью подвижных фаз А:Б (90:10) со скоростью 0,8 мл/мин до формирования стабильной базовой линии. Относительное время удерживания мирамистина около 7 мин. *Проверка пригодности хроматографической системы:* Для проверки пригодности хроматографической системы хроматографируют стандартный раствор мирамистина, получая не менее 5 хроматограмм. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику мирамистина, должна быть не менее 2000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика мирамистина на повторных хроматограммах стандартного раствора, должно быть не более 2,0%;
- коэффициент асимметрии пика (Т) мирамистина должен быть не более 2,5.

Далее хроматографируют последовательно равные объемы испытуемого и стандартного растворов, регистрируют хроматограммы. Содержание мирамистина в ГЛФ (X), в % рассчитывают по формуле (2):

$$X = \frac{S_1 \times a_0 \times 100 \times P}{S_0 \times 200 \times a_1 \times 0,05}, \quad (2)$$

- где S_1 – площадь пика мирамистина на хроматограмме испытуемого раствора;
- S_0 – площадь пика мирамистина на хроматограмме стандартного раствора лидокаина;
- a_1 – навеска геля, используемая для приготовления испытуемого раствора, в граммах;

- a_0 – навеска СО мирамистина, в миллиграммах;
 Р – содержание активного вещества в СО мирамистина, в процентах.

Содержание мирамистина в геле ранозаживляющем: от 95 до 105% от заявленного количества.

2.5 Методика определения лидокаина методом ВЭЖХ

Методику проводили аналогично проведению методики определения мирамистина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий».

Относительное время удерживания лидокаина около 4 мин.

Содержание лидокаина в ГЛФ: от 95 до 105% от заявленного количества.

2.6 Методика определения микробиологической чистоты

Разработанный ЛП относится к категории 2 «Для применения местно, наружно, интравагинально». Рекомендуемые требования: общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата; отсутствие *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл) препарата. Для исследования использовались образцы ГЛФ «Гель ранозаживляющий» с различным содержанием мирамистина, в качестве контроля использовалась основа без действующих веществ, препарат сравнения – мазь левомеколь.

Использовались культуры:

Staphylococcus aureus (золотистый стафилококк) – вид шаровидных грамположительных бактерий из рода стафилококков.

Escherichia coli (кишечная палочка) – вид грамотрицательных палочковидных бактерий.

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) – вид грамотрицательных подвижных палочковидных бактерий.

Enterobacter aerogenes (энтеробактериям) – вид грамотрицательных палочкообразных перитрихальных споронеобразующих бактерий.

Candida albicans (кандида) – диплоидный грибок (форма дрожжеподобных грибов).

Лучшие показатели получены при использовании в составе геля 0,05 и 0,10% мирамистина. Однако антимикробный эффект геля, содержащего 0,10% мирамистина, незначительно превосходит эффект геля с 0,05% мирамистином. Кроме того, следует учитывать стоимость мирамистина, а также стремиться к минимизации лекарственной нагрузки на организм пациента.

В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота» 1.2.4.0002.18 [35].

- микробиологическая чистота субстанций синтетического происхождения для производства нестерильных ЛП должна удовлетворять следующим требованиям [86]:
 - общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл);
 - общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл);
 - отсутствие *Escherichia coli* в 1 г (мл).
- микробиологическая чистота вспомогательных веществ для производства ЛП:
 - общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл);
 - общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл);
 - отсутствие *Escherichia coli* – в 1 г (мл);
 - отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 25 г (мл);
 - отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл);
 - отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл);
 - энтеробактерий, устойчивых к желчи, – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)
- микробиологическая чистота ЛП для введения в полости носа должна удовлетворять следующим требованиям:
 - общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата;
 - отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) препарата;
 - отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл) препарата;
 - отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл) препаратов, используемых респираторно.

Для назальных лекарственных форм установлено следующее ограничение по наличию микроорганизмов:

- Общее число аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата;
- Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) препарата;
- Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл) препарата [86].

2.7 Методика определения реологических характеристик геля

Целью экспериментальных исследований являлась разработка методики определения эффективной вязкости ГЛФ «Гель ранооживляющий», представляющего собой гелеобразную гомогенную массу без механических включений, молочно-белого цвета, без запаха. Изучение проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.2.1.0015.15 «Вязкость» [35].

ГЛФ «Гель ранооживляющий», разработанная на основе высокомолекулярных полисахаридов и полимеров, относится к псевдопластичным жидкостям, характеризующимся структурной или эффективной вязкостью.

Основное оборудование: Ротационный вискозиметр Rheotest RN4.1 с программным обеспечением, в измерительной системе типа «цилиндр в цилиндре» ms din 33 и ms din 11 (объем ячейки 17 и 32 мл соответственно), при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, в диапазоне изменения градиента скорости сдвига от 5 до 300 c^{-1} . Строили реограммы, отражающие зависимость касательного напряжения сдвига τ_r от градиента скорости сдвига D_r . По кривой текучести определяли тип течения системы, наличие тиксотропных свойств, нижний, верхний и экстраполированный пределы текучести, рассчитывали структурную вязкость по формуле (3):

$$\eta = \tau_r / D_r, (3)$$

Подготовка к испытанию: Цилиндрическое устройство для измерения вязкости подготавливают к проведению испытаний: все детали измерительного устройства промывают растворителем, просушивают и собирают. Навеску геля массой около 30 г (~ 30 мл) помещают в камеру внешнего цилиндра, который подсоединяют к вискозиметру в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

Порядок проведения испытания: Собранное измерительное устройство соединяют с термостатом и выдерживают не менее 30 мин при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$.

В соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора проводят измерение эффективной вязкости испытуемого раствора в заданном диапазоне изменения градиента скорости сдвига от 5 до 300 c^{-1} , в течение 200 секунд. Результат измерения регистрируют на дисплее компьютера и сводят в таблицу.

Требуемое значение показателя качества: Эффективная вязкость ГЛФ должна быть в интервале от 0,7 до 1,2 Па·с.

2.8 Методика определения характеристик поверхности методом атомно-силовой микроскопии

Для изучения характеристик поверхности был использован атомно-силовой микроскоп (АСМ) Ntegra Prima (NT-MDT, Россия), который был оснащен сканером и кремниевым кантелевером HA-NC Etalon (длина консоли 124 мкм, силовая константа 3,5 Н/м, резонансная частота 140 кГц, радиус закругления иглы менее 10 нм в соответствии с производственной спецификацией) [53].

Выводы к главе 2

1. При проведении исследований соблюдены требования к номенклатуре параметров, к точности их определения и точности воспроизведения внешних условий; использовалась международная система единиц СИ в соответствии с ГОСТ 8.417-2002 «Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы величин» и действующее издание Государственной Фармакопеи.

2. В работе использованы материалы и методы, соответствующие требованиям нормативных документов, стандартов и технических условий.

3. Стандартизация лекарственного средства базировалась на современном подходе к стандартизации лекарственных средств (Государственная фармакопея Российской Федерации). В работе использованы современные фармакопейные методы исследования (методы физического и физико-химического анализа, методы количественного и качественного анализа).

ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «ГЕЛЬ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ» ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, НА ОСНОВЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ КОМПЛЕКСА ХИТОЗАН-ХИМОПСИН И КОМПЛЕКСА ХИТОЗАН- МИРАМИСТИН

Принцип «качество, запланированное при разработке» (Quality-by-Design, QbD) ставит перед собой цель достижения необходимых для пациента свойств лекарственного средства через обеспечение непрерывного соответствия запланированным значениям всех параметров и характеристик технологического процесса, функционально связанных с безопасностью и эффективностью.

Целью исследований на стадии фармацевтической разработки является проектирование продукта и процесса его производства для достижения планируемой эффективности и ожиданий пациентов, специалистов здравоохранения и регуляторных органов.

Фармацевтическая разработка требует многофакторных научных исследований во взаимосвязи друг с другом. Одна из ее задач – определение пространства проектных параметров (design space) – многофакторной комбинации и взаимодействия входящих переменных (например, характеристик материала), а также параметров процесса, при которых доказано обеспечение качества.

В рамках выполняемой диссертационной работы в соответствии международными требованиями и подходами [31, 32] нами были изучены следующие элементы фармацевтической разработки:

- действующие вещества ЛП: фармацевтическая субстанция; вспомогательные вещества;
- ЛП: разработка лекарственной формы; физико-химические свойства (контроль качества); разработка технологического процесса; система упаковки (укупорки); микробиологические характеристики.

Целевой профиль качества препарата (клиническое значение, эффективность и безопасность) формирует основу для разработки продукта. Целевой профиль качества мягких лекарственных форм в значительной степени зависит от их структурно-механических свойств, биодоступности, стабильности, служащих критерием определения качества гелей с учетом их фармакологической эффективности, как при производстве, так и в процессе хранения.

Целью настоящего научно-исследовательского (диссертационного) исследования была разработка комбинированного лекарственного средства в форме геля для наружного применения с комплексной протеолитической, антимикробной и регенерирующей активностью для местной

терапии инфицированных ран различного генеза, купирующего болевой синдром и способствующего процессу регенерации.

В настоящее время известны различные формы ЛП, используемых для местного применения в качестве ранозаживляющих средств. В зависимости от лекарственной формы их можно разделить на мази, растворы и гели.

В случае разработки наружного лекарственного средства для лечения ран, важную роль также играет определение критических характеристик качества фармацевтических субстанций, выбор типа и количества вспомогательных веществ исходя из конечной цели – максимальной биодоступности активных ингредиентов в лекарственном средстве при нанесении на поврежденную поверхность - раневой дефект.

Гелевая форма препарата для лечения воспалительных процессов, особенно сложных, является предпочтительной, как в плане использования водной основы, так и других серьезных преимуществ: мягкое щадящее воздействие на поврежденную поверхность, сохранение влажной среды, понижение температуры и благодаря этому косвенный обезболивающий эффект. Гидрогели оказывают мягкое воздействие, когда более агрессивные способы лечения нежелательны или противопоказаны.

ГЛФ «Гель ранозаживляющий» – ЛП, представляющий собой многокомпонентную композицию, состоящую из основы и действующих веществ: комплекса хитозан-химопсин, комплекса хитозан-мирамистин и лидокаина.

В состав основы входят гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ), полиакриламид (ПАА), глицерин и вода. «Гель ранозаживляющий» обладает комплексной терапевтической активностью: комплекс хитозан–химопсин обеспечивает ферментативное очищение раны от гнойно–некротических масс за счет лизиса денатурированных белков, комплекс хитозан–мирамистин оказывает пролонгированное антимикробное и фунгицидное действие, лидокаин ослабляет болевой эффект.

Учитывая особенности введения – в рану, к предлагаемой лечебной композиции предъявляются следующие требования: биосовместимость с тканями человека, отсутствие аллергических реакций, пирогенного и токсического действия на ткани. В случае разработки такого лекарственного средства важную роль играет выбор, как самой лекарственной формы, так и вспомогательных веществ, ее формирующих.

Критические характеристики качества ГЛФ зависят от физико-химических, биологических, микробиологических свойств действующих и вспомогательных веществ, обеспечивающих терапевтическое действие ЛП, и технологию его получения.

Поэтому в каждом конкретном случае необходимо проводить подбор оптимального состава и процесса получения ГЛФ.

3.1 Разработка состава ГЛФ «Гель ранозаживляющий» для наружного применения

3.1.1 Фармацевтическая субстанция

Фармацевтическая субстанция (или несколько фармацевтических субстанций) – основное действующее вещество ЛП, за счет которого реализуется его терапевтический эффект, является стандартизованным биологически активным веществом или стандартизованной смесью биологически активных веществ, предназначенной для получения лекарственных средств.

Для оценки потенциального влияния физико-химических свойств фармацевтической субстанции на действие ЛП необходимо учитывать ряд критериев. Например, документ ICH Q6A «Спецификации: процедуры анализа и критерии приемлемости для действующих веществ и новых лекарственных форм. Химические вещества» описывает некоторые условия, в которых рекомендовано изучение лекарственных средств.

Должны быть идентифицированы и обсуждены физико-химические и биологические свойства фармацевтической субстанции, которые могут повлиять на действие продукта и его технологичность, в т.ч. специально заложенные в проект: вероятность образования комплексов, биологическая активность, вязкость, микробиологическая чистота. Эти свойства могут быть взаимосвязаны, по этой причине может потребоваться их совместное рассмотрение.

Выбор действующих веществ базировался на теоретической и экспериментальной основе. Так как ГЛФ представляет собой комбинированное лекарственное средство, состоящее из двух комплексов, необходимо было изучить вопрос о совместимости действующих веществ друг с другом во избежание образования новых соединений, которые могут исказить терапевтический эффект, либо привести к образованию токсического продукта.

Важно было не только получить ЛП с высокой специфической активностью, но и сохранить ее в соответствии со сроком годности лекарственного средства [121, 122, 123].

Разработанный ЛП содержит две фармацевтические субстанции на основе кислоторастворимого ХТ, разработанные в Центре фармацевтических технологий Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России.

Первая субстанция представляет собой инновационный комплекс хитозан–химопсин [122, 123]. Состав комплекса хитозан–химопсин представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Состав комплекса хитозан- химопсин

Состав	Количество, г
Химопсин	0,20
Хитозан	1,00
Вода очищенная	до 100,00

Описание – лиофилизированная масса в виде порошка, комков или пластинок белого, или светло-желтого цвета, со слабым запахом уксусной кислоты, представляет собой комбинированную фармацевтическую субстанцию ферментного препарата протеолитического действия – химопсина и высокомолекулярного полисахарида природного происхождения – Хт кислоторастворимого.

Растворимость. Образует с водой коллоидные системы; нерастворим в эфире, гексане, этаноле 95 %.

Содержание: от 99,0 до 101,0%.

Выбор ферментного комплекса химопсина, как составной части протеолитического комплекса хитозан-химопсин, объясняется тем, что использование природной смеси протеолитических ферментов (химотрипсин и трипсин), повышает эффективность терапии за счет усиления лечебного действия благодаря более быстрому и полному гидролизу пептидных связей.

Компоненты химопсина расщепляют различные пептидные связи в белковой молекуле: трипсин гидролизует пептидные связи, содержащие остатки аргинина и лизина; химотрипсин расщепляет пептидные связи с остатками ароматических аминокислот – тирозина и триптофана.

Вторая фармацевтическая субстанция – инновационный комплекс хитозан–мирамистин [122, 123]. Состав комплекса хитозан- мирамистин представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Состав комплекса хитозан- мирамистин

Состав	Количество, г
Мирамистин	0,05
Хитозан	1,00
Вода очищенная	до 100,00

Описание – лиофилизированная масса в виде рыхлого порошка, комочков или пластинок белого, или светло-желтого цвета, со слабым запахом уксусной кислоты.

Растворимость: легко растворима в воде, комплекс нерастворим в эфире, гексане, этаноле 95%.

Содержание: от 99,0 до 101,0%.

Полисахаридный комплекс хитозан-мирамистин обеспечивает пролонгированное антимикробное и фунгицидное действие, усиливает функциональную активность иммунных клеток, при стимуляции местного (неспецифического) иммунитета [72]. Комплекс хитозан–мирамистин ускоряет процесс заживления ран, обеспечивает снижение резистентности

патогенных микроорганизмов к антибактериальной терапии, а также активацию защитных реакций в месте применения, за счет активации поглотительной и переваривающей функции фагоцитов [72].

Исходя из НД субстанций, эмпирическим путем было рассчитано количество фармацевтических субстанций в составе ГЛФ. В комплексе хитозан–химопсин необходимая протеолитическая активность соответствует 2,0% химопсина в 100,0 г субстанции. Количество мирамистина в ГЛФ было установлено из результатов микробиологических исследований комплекса хитозан–мирамистин и составило 0,5% на 100,0 г.

3.1.2 Вспомогательные вещества. Требования к полимерной композиции

Выбор вспомогательных веществ, их концентрации и характеристики могут оказать влияние на действие ЛП (устойчивость, биодоступность) или возможности производства.

Выбор состава и метода получения полимерных композиций ГЛФ определяется физико-химическими свойствами самого действующего или нескольких веществ (размером молекулы, полярностью, наличием заряженных функциональных групп, растворимостью в различных растворителях, способностью образовывать водородные связи и т. д.). В каждом конкретном случае необходимо проводить подбор оптимального состава и процесса получения полимерной формы лекарственного средства.

Основными требованиями к полимерной композиции является ее антиаллергенность, биосовместимость и безопасность. Полимер должен транспортировать действующие вещества в организм, в том числе в рану, не снижать их активность, быть способным к биодеструкции, в том числе к гидролизу под действием ферментов организма, быть биологически активным, желателно, оказывать собственный лечебный эффект (являясь «пролекарством» - превращаясь в лекарство в результате метаболических процессов), обеспечивать основные технологические параметры композиции, необходимые для создания ГЛФ. Всем перечисленным требованиям для формирования полимерной композиции отвечают природные полимеры, что обуславливает целесообразность их применения.

Выбор биополимеров для композиции – сложная проблема, так как создаваемая система должна осуществлять направленную доставку лекарственного вещества к поврежденному участку, обеспечивать его высвобождение в нужный момент и в оптимальном количестве, необходимом для лечения. Скорость высвобождения действующих веществ контролируется количеством действующих веществ в матрице, что определяет градиент концентрации на границе рана – лекарство, степенью и скоростью гидратации полимерной композиции, кинетикой набухания биополимера. Эту скорость можно направленно менять за счет изменения концентрации ЛП или биополимера в полимерной матрице, введения сшивающих агентов. Для

создания полимерных композиций широко используются такие биополимеры как полисахариды – производные целлюлозы, альгинаты, производные хитина, соли гиалуроновой кислоты, пектины.

Во многих случаях в качестве основы для создания носителей действующих веществ используются полимеры, хорошо изученные как компоненты ранозаживления, взаимодействие которых с организмом исследовано достаточно глубоко, в том числе Хт. В качестве основных преимуществ Хт, как носителя, можно указать возможность переноса иммобилизованных частиц действующего вещества в очаг поражения, хорошую биосовместимость с тканями макроорганизма, а также отсутствие токсичных продуктов разложения.

Среди производных целлюлозы в фармацевтике используются, в основном, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (NaКМЦ); метилгидроксиэтилцеллюлоза; ГПМЦ.

ГПМЦ инертна к большинству активных и вспомогательных веществ, обладает хорошей текучестью, растворима в воде в любых пропорциях с образованием прозрачной жидкости различной вязкости, в зависимости от ее типа. При увеличении температуры или скорости перемешивания, вязкость обратимо уменьшается. В данном случае очень важно, что ГПМЦ является хорошим гелеобразующим агентом, инертна к большинству активных и вспомогательных веществ, что имеет значение в данном случае при разработке технологии многокомпонентного лекарственного средства на гелевой основе.

Поэтому в рамках данной работы была предпринята попытка разработать такую технологию получения оптимального состава геля для лечения инфицированных ран, который при сохранении лечебного действия позволил бы увеличить время непосредственного контакта с поврежденными тканями, чтобы продлить лечебный эффект и снизить количество перевязок.

Предлагаемое технологическое решение заключается в разработке гидрогелевых аппликаций с физически иммобилизованными в необходимых, по медицинским показаниям, концентрациях действующих веществ, достоинством которых является обеспечение дифференцированного подведения лекарственного вещества к поврежденным тканям, пролонгация за счет структуры депо-носителя, свойств полимерной матрицы и специфики применения ЛП.

На основании изучения процесса набухания полимеров, входящих в основу, реологических особенностей гидрогелевых систем разработана научно обоснованная технология получения ЛП в гелевой форме пролонгированного действия.

3.1.3 Теоретическое и экспериментальное обоснование выбора полимерной основы

Основные требования к гелям, так же, как и к мазям, предполагают не только подбор фармакологически активных веществ, но и выбор оптимальной основы. Поэтому, как правило,

на первой стадии раневого процесса применяют средства, обладающие достаточными осмотическими свойствами для удаления раневого отделяемого.

На этапе фармацевтической разработки ГЛФ были разработаны модельные условия для апробации составов лекарственного средства для лечения инфицированных ран. Для этого необходимо было создать доступную модель, воспроизводящую раневые условия *in vitro*. Хорошо известно, что при проведении доклинических исследований лекарственных средств для лечения ран создается модель раны у экспериментальных животных согласно требованиям, к проведению доклинических исследований.

В данном случае необходимо было разработать модель раны, представив ее из двух основных составляющих – непосредственно раневого дефекта, то есть поврежденной поверхности, и раневого отделяемого – экссудата. Модель разрабатывалась на основании требуемых реологических характеристик и значения pH.

Исходя из свойств системы «раневого дефект – раневое отделяемое», для моделирования поведения разрабатываемого ЛП необходимо было провести разработку подложки (раневого дефект) и среды (раневого отделяемого) из искусственных материалов.

Поведение ЛП в такой системе будет характеризоваться следующими параметрами:

- моделированием раневой поверхности;
- осмотической активностью;
- взаимодействием модельного отделяемого с такими компонентами, как Хт, ПАА, глицерин.

На основании этих показателей была проведена разработка искусственного модельного отделяемого и подбор поверхности, имитирующей по отношению к отделяемому, раневой дефект. При выборе веществ, используемых в разработке модельного отделяемого, учитывались следующие критерии:

- реологические параметры модельной жидкости должны быть стандартными и максимально близки к характерным для раневого отделяемого;
- вещества, необходимые для создания модельной жидкости, должны быть относительно доступными (наличие на отечественном рынке химических веществ, относительная дешевизна);
- вещества должны быть безопасными;
- процесс создания модельного отделяемого должен быть воспроизводимым (простота приготовления).

В процессе разработки были исследованы растворы следующих веществ:

- натриевой соли поликарбосиметилового эфира целлюлозы (NaКМЦ);

- метилгидроксиэтилцеллюлозы;
- ГПМЦ

С этой целью готовились водные растворы перечисленных веществ с различными концентрациями: NaКМЦ 1 – 2%; метилгидроксиэтилцеллюлоза 1 – 2% и ГПМЦ от 0,5– 6,0%. Полученные растворы были исследованы по показателю вязкости на вискозиметре типа РЕОТЕСТ- RN4.1 по ГОСТ 10028.

На основании полученных данных была проведена оценка зависимости вязкости исследуемых растворов от их концентрации (табл. 3).

Таблица 3 – Вязкость исследуемых растворов производных целлюлозы

Растворы натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (NaКМЦ)							
Концентрация, %	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	-	-	-	-	-
Вязкость, Па·с	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	-	-	-	-	-
Растворы метилгидроксиэтилцеллюлозы							
Концентрация, %	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	-	-	-	-	-
Вязкость, Па·с	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	-	-	-	-	-
Растворы гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ)							
Концентрация, %	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1
Вязкость, Па·с	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1	3,2 ± 0,1

По результатам проведенной оценки из полученных растворов, были выбраны растворы ГПМЦ, а из растворов NaКМЦ те растворы, вязкость которых лежала в диапазоне от (0,6±0,1) до (1,0±0,1) Па·с, то есть приближалась к значениям вязкости раневого отделяемого (экссудата).

Растворы гидроксипропилметилцеллюлозы других концентраций также были выбраны для последующих экспериментов, при изучении гелеобразующих свойств с другими компонентами основы.

В последствие на основании данных этого эксперимента готовились основы для ГЛФ из растворов ГПМЦ, различных концентраций.

Следующим этапом исследований явилось создание поверхности, имитирующей поверхность раневого дефекта. В ходе анализа литературных данных была выбрана композиция, получаемая на основе акриламида. Полиакриламидный гидрогель (ПАА), для получения которого использовали порошковую форму ПАА производства НТФ «Атомбиотех». ПАА – прозрачный бесцветный желеобразный гомогенный материал, является однокомпонентной системой, т.е. не содержит сшивающие соединения, металлы, масла, стабилизаторы, соли, легко растворяется в воде. В отличие от карбомеров и карбополов ПАА является радиационно сшитым полимером, содержащим в своем составе около 3% мономеров в виде акрилатов.

Были получены гели ПАА из растворов различных концентраций. ПАА в необходимых количествах взвешивали на аналитических весах помещали в колбу емкостью 100 мл, добавляли

воду очищенную, предварительно подогретую до 65 °С и перемешивали. Затем раствор оставляли на сутки до полного растворения вещества, набухания и структурирования геля. Готовились растворы с концентрацией ПАА от 0,3 до 3,0%. Измеряли рН полученных растворов, значения рН находились в диапазоне от 6,8 до 7,5.

Из гелевых растворов ПАА на чашках Петри получали тонкие пленки путем высушивания при комнатной температуре. Однако полученные пленки были хрупкими и проявляли ломкость. В целях устранения этого дефекта добавляли небольшое количество глицерина (не более 5,0 г на 100 г раствора), после чего пленки становились эластичными и прочными.

Полиакриламидную пленку получали в чашке Петри, площадь которой составляла 23,75 см². На поверхность готовой пленки наносили раствор ГПМЦ 2%, в количестве, необходимом для равномерного распределения по всей поверхности пленки, т.е. около 8,0 мл, накрывали сверху крышкой и термостатировали при 37 °С. При этом в чашке создавались условия влажности, предотвращающие преждевременную потерю воды модельным отделяемым. В целях изучения процесса моделирования раневой поверхности гидроксипропилметилцеллюлозой на пленку наносились капли ГПМЦ, которые сохраняли ровные контуры и не растекались.

На следующем этапе разработки исследовали взаимодействие модельного отделяемого с гидрофильными соединениями на примере воды, глицерина и Хт кислоторастворимого.

В химический стакан, вместимостью 150,0 мл помещали 15,0 г модельной среды (раствор ГПМЦ 2%), при включенной лопастной мешалке (100 об/мин), добавляли 5, 10, 20, 30, 40, ...100 г воды очищенной. Добавление воды приводило к разжижению системы, но раствор ГПМЦ 2% смешивался с водой во всех соотношениях.

Аналогично проводили эксперимент по взаимодействию раствора ГПМЦ 2 % с раствором Хт кислоторастворимого. Было обнаружено, что добавление Хт в виде гелевого раствора в соотношении 1:1 приводило к образованию устойчивой однородной гелевой системы. Разделение фаз не наблюдалось.

Также наблюдалось взаимодействие ГПМЦ с глицерином, который добавляли для предотвращения высыхания системы и придания ей эластичности. Глицерин добавляли в количестве от 2 до 5%, что не нарушало устойчивости и однородности системы. Внешних признаков нежелательного взаимодействия (изменения окраски, образования осадка, выделения газа) при совместном присутствии компонентов основы в геле обнаружено не было.

Для исследования совместимости действующих веществ разрабатываемого геля с основами готовили образцы основ и вводили растворы действующих веществ в индивидуальном порядке в основу. Полученные образцы представляли собой стабильные составы с приемлемыми органолептическими характеристиками.

В ходе разработки состава и технологии основы геля были получены 9 экспериментальных образцов.

Экспериментальные составы представляли собой гелевую матричную многокомпонентную основу из производных целлюлозы, Хт и производных акриловой кислоты, которые были представлены различными концентрациями.

В ходе проведенных исследований было обнаружено значительное влияние модификаторов вязкости на биофармацевтические характеристики ГЛФ. Предположительно, это связано с различным строением производных целлюлозы, длиной полимерных цепей и, как следствие, различной плотностью образующихся полимерных гелевых структур.

Несмотря на то, что Хт является составной частью разработанных фармацевтических субстанций, он был включен в состав основ для проведения ряда экспериментов. Составы образцов представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Составы образцов геля (г)

Образцы	ГПМЦ	ПАА	Хт	Глицерин	Вода, до
Образец 1	4,00	0,20	1,00	4,00	100,00
Образец 2	3,50	0,20	1,00	4,50	100,00
Образец 3	3,00	0,20	1,00	5,00	100,00
Образец 4	2,50	0,10	1,00	5,00	100,00
Образец 5	3,50	0,20	2,00	4,50	100,00
Образец 6	2,00	0,10	2,00	5,00	100,00
Образец 7	1,00	0,10	1,00	5,00	100,00
Образец 8	0,70	0,15	1,00	5,00	100,00
Образец 9	0,50	0,10	1,00	5,00	100,00

Были выбраны интактные полимеры – ГПМЦ и ПАА. Хт, который, является компонентом двух фармацевтических субстанций, усиливает биологическую активность этих полимеров.

В этом случае к таким полимерам применим термин «пролекарство». Так как Хт является составной частью фармацевтических субстанций, то необходимо было изучить его гелеобразующие свойства при исследовании свойств других компонентов основы геля.

По мере набухания и биодegradации импрегнированные в гель действующие вещества десорбируют к поврежденной поверхности и затем, за счет градиента концентраций в матрице и в биологическом субстрате (в данном случае в ране) проникают к очагу поражения.

Исходя из этого, был изучен процесс набухания и частичного растворения полимерных пленок для определения скорости высвобождения действующих веществ из полимерной основы во внешнюю среду, что позволило создать лечебную композицию с заранее заданными свойствами (временем лечебного действия и пролонгации действия ГЛФ).

Для использования в качестве гелеобразователя полимеры должны обладать определенными технологическими параметрами для возможности их использования в качестве основы.

У биополимеров-гелеобразователей при аппликации на поврежденную поверхность с биополимерного слоя удастся получить гидрофильную пленку, которая обеспечивает прилегание лечебного геля к поверхности и контакт слоя с поверхностью, через которую должно перейти лекарственное средство.

За счет гидрофильности используемых биополимеров существует электролитная среда для высвобождения действующих веществ.

Таким образом, биополимерная композиция является «депо» для физически импрегнированного в ней лекарственного средства, т.к. градиент концентраций на границе рана-поверхность полимерного слоя существенно ниже.

Кроме того, используемые биополимеры, обладают репаративными свойствами, например, Хт, препятствуют воспалению, увлажненный слой полимера существенно упрощает выход действующих веществ, т.е. способствует атравматичности предлагаемой гелевой формы.

Другой показатель – скорость биodeградации полимеров – связан с их набуханием, и этот показатель во многом определяет кинетику и полноту высвобождения физически иммобилизованных в полимере действующих веществ.

3.1.4 Изучение реологических свойств компонентов основы и ГЛФ

С целью определения критической характеристики качества для правильной организации технологического процесса, установления параметров качества и определения оптимальных условий хранения, изучали реологические свойства геля.

Способность необратимо деформироваться гель приобретает в результате увеличения кинетической энергии частиц его структурного каркаса вследствие разрыва связей между ними.

Реологические характеристики мягких ГЛФ зависят от природы и количественных соотношений всех компонентов системы, степени их обработки, температуры и других факторов.

С целью выбора концентрации основного компонента основы геля – ГПМЦ были изучены реологические свойства образцов ГЛФ на основе 1 и 2% растворов ГПМЦ.

Реологические свойства образцов ГЛФ, изготовленных на основе 1 и 2% растворов ГПМЦ, изучали на автоматическом универсальном ротационном вискозиметре (Rheotest RN4.1, Германия) с программным обеспечением в измерительной системе типа «цилиндр в цилиндре» ms din 33 и ms din 11 (объем ячейки 17 и 32 мл соответственно), при температуре $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, в диапазоне изменения градиента скорости сдвига от 5 до 300 c^{-1} .

Для изучения реологических характеристик образцов ГЛФ строили кривые вязкости и течения, а также определяли предел текучести и вязкость по реологической модели Кэссона. Кривые вязкости, построенные в координатах зависимости вязкости от градиента скорости сдвига, дают представление о тиксотропных свойствах исследуемых образцов [6].

Наиболее наглядно тиксотропный эффект наблюдался в условиях циклических сдвиговых деформаций «малый сдвиг - большой сдвиг - малый сдвиг», когда структура материала сначала разрушается на нисходящей ветви зависимости, а затем восстанавливается на восходящей части цикла, образуя так называемую «петлю гистерезиса» [6].

Динамическую вязкость образцов ГЛФ на основе 1 и 2% ГПМЦ изучали при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ в диапазоне градиента скоростей сдвига от 5 до 300 c^{-1} . Реограммы образцов ГЛФ представлены на рисунках 2 и 3.

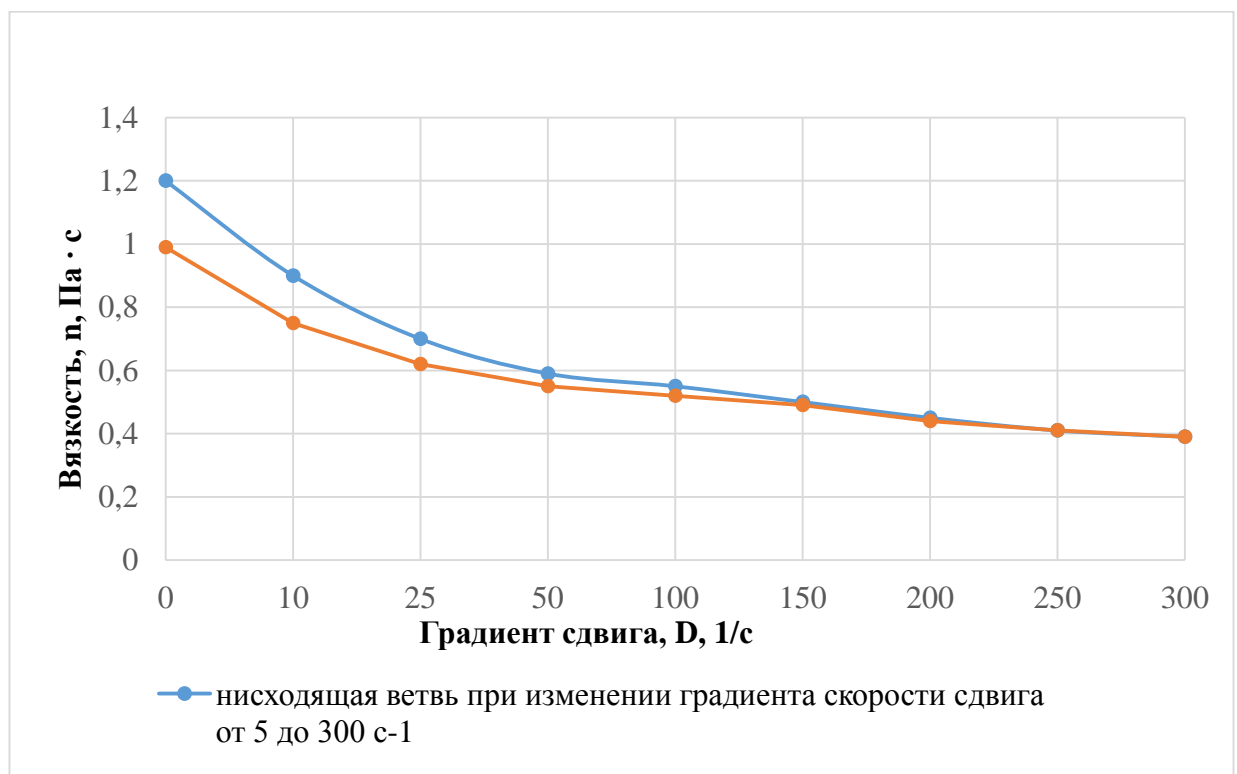


Рисунок 2 – Кривые вязкости образцов ГЛФ на основе 1% ГПМЦ

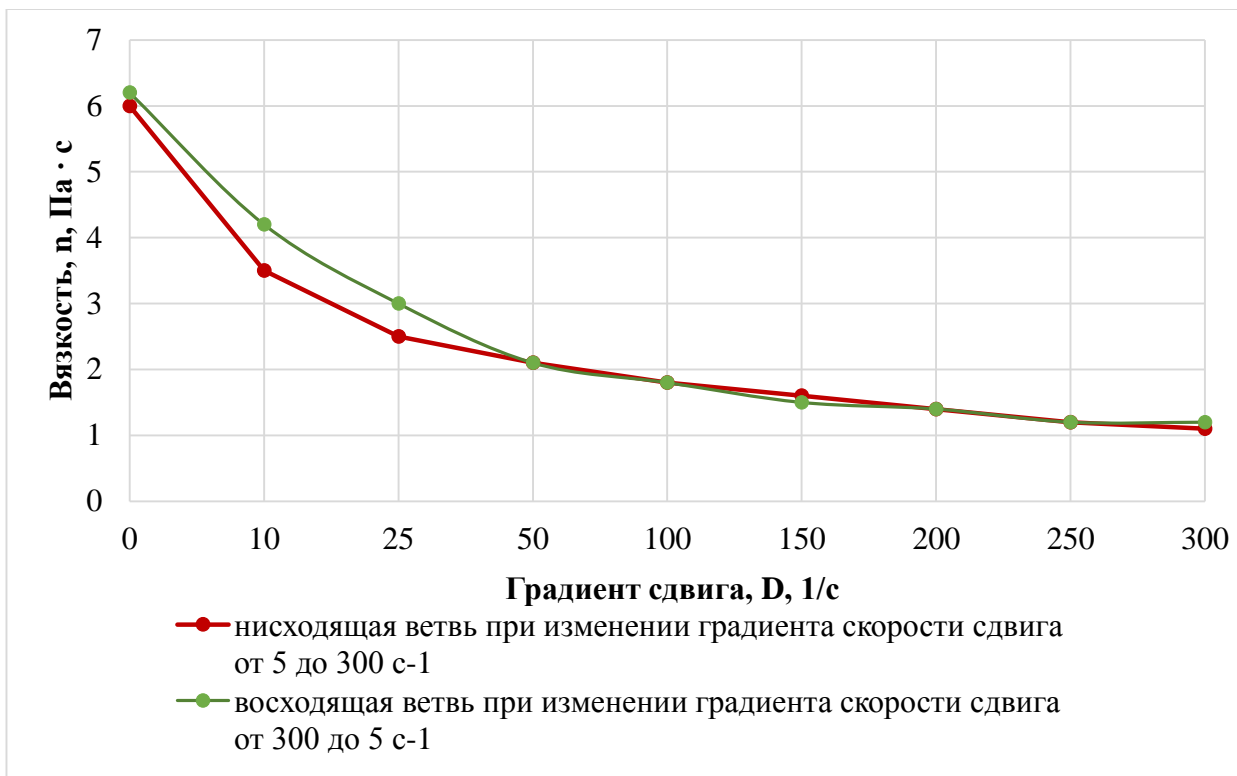


Рисунок 3 – Кривые вязкости образцов ГЛФ на основе 2% ГПМЦ

Для исследуемых образцов ГЛФ обоих составов величины динамической вязкости при одинаковых значениях скоростей сдвига нисходящего и восходящего циклов были в значительной степени эквивалентны.

Все исследуемые образцы обладали высокой степенью тиксотропии. Но значения динамической вязкости образцов ГЛФ на основе 2% ГПМЦ значительно (более чем в 5 раз) превосходили аналогичные параметры образцов ГЛФ на основе 1% ГПМЦ.

Тиксотропный эффект их был более выраженным и достигал почти исходного значения вязкости при изменении градиента скорости сдвига 5 до 300 c^{-1} .

На объединенном графическом изображении реограмм образцов ГЛФ (рис.4) наглядно продемонстрировано преимущество реологических свойств образцов ГЛФ на основе 2% ГПМЦ по сравнению с 1% ГПМЦ.

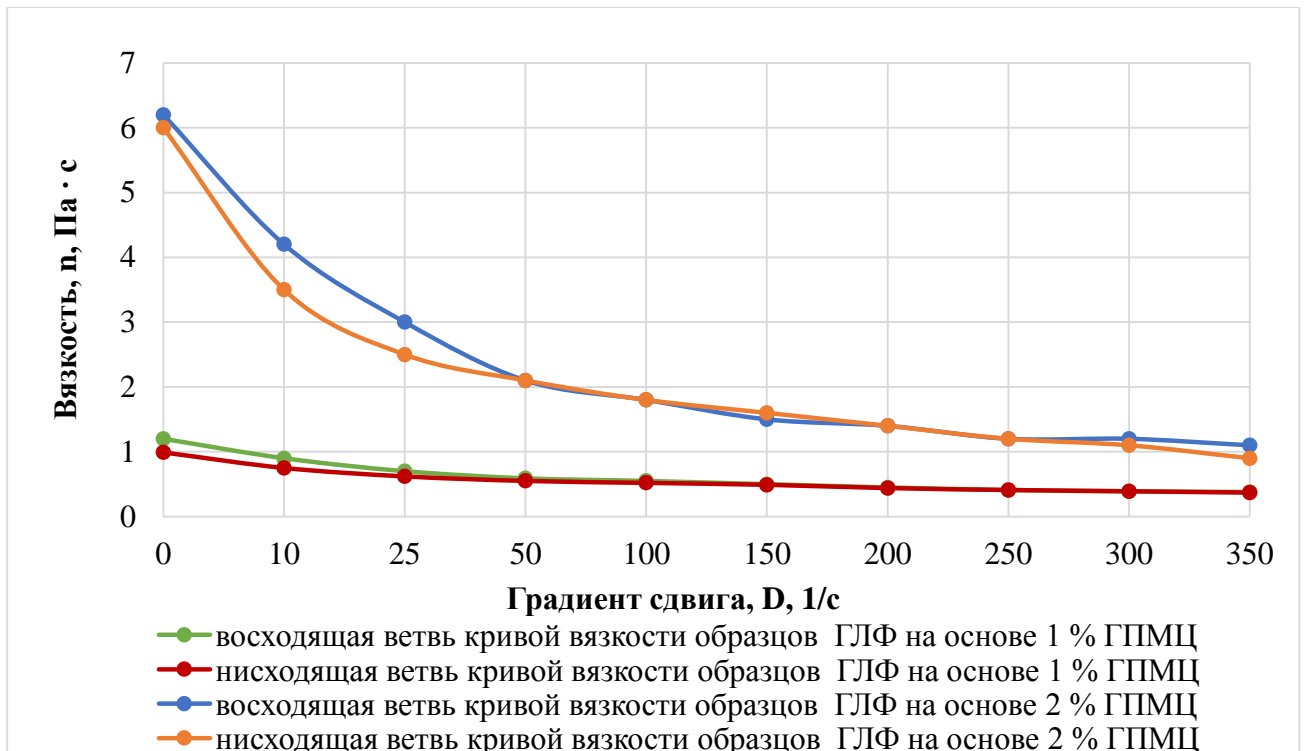


Рисунок 4 – Кривые вязкости образцов ГЛФ при изменении градиента скорости сдвига от 5 до 300 c^{-1}

По кривым течения экспериментальных образцов можно достоверно судить о типе течения и косвенно – о пределе текучести [6].

С этой целью были проведены эксперименты по изучению поведения образцов ГЛФ при изменении градиента скорости сдвига в широком диапазоне от 5,0 до 1000 c^{-1} и получены графики зависимости напряжения сдвига от градиента скорости сдвига (рис. 5).

Пластическая вязкость образцов ГЛФ на основе 1 и 2% ГПМЦ составила соответственно 0,750 Па·с и 1,2 Па·с, пределы текучести образцов – 14,4 Па и 25,2 Па, соответственно.

Таким образом, исследуемые образцы ГЛФ на основе 2% ГПМЦ имеют величину пластической вязкости в 2,5 раза, а предел текучести в 1,5 раза больше вязкости и предела текучести образцов ГЛФ на основе 1% ГПМЦ.

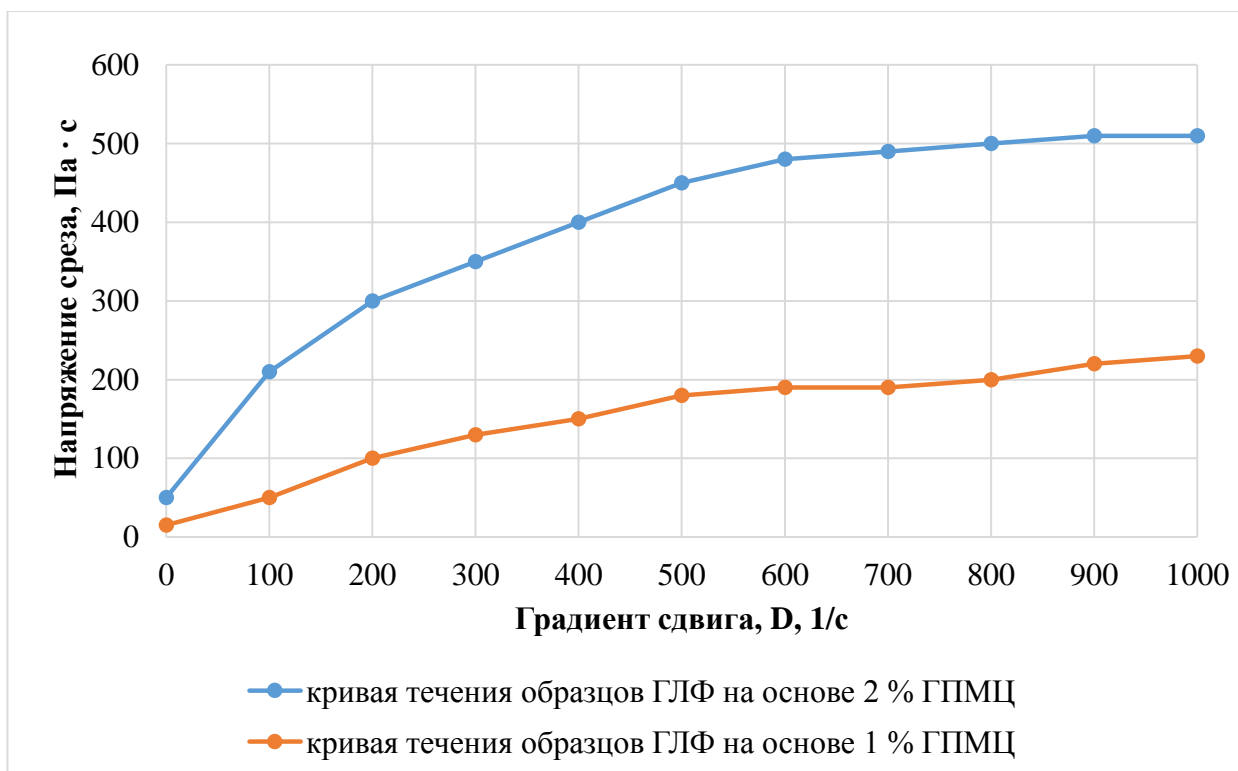


Рисунок 5 – Кривые течения образцов ГЛФ при изменении градиента скорости сдвига от 5 до 1000 с⁻¹

Критическим показателем качественной оценки вязко-пластичных форм по их реологическим характеристикам является предел текучести, характеризующий прочность гелевой структуры, а, следовательно, агрегативную стабильность, необходимую в процессе производства, хранения и применения [6]. По этому показателю и по вязкости образцы ГЛФ на основе 1% ГПМЦ уступают образцам ГЛФ на основе 2% ГПМЦ, поэтому в качестве модификатора вязкости был выбран состав основы с применением 2% ГПМЦ.

Введение лидокаина в композицию не приводит к резкому изменению вязкости системы. Лидокаин является легко растворимым действующим веществом и незначительное падение вязкости не оказывает влияния на реологические характеристики композиции. Данные системы обладают тиксотропными свойствами, они самопроизвольно восстанавливаются после механического разрушения при нагрузке, т.е. способны фактически полностью восстановить свою внутреннюю структуру после снятия нагрузки.

Что касается остальных действующих веществ – химопсина и мирамистина, они также являются легко растворимыми веществами и не нарушают структурной конформации полимеров-носителей. Кроме того, во всех случаях включение действующего вещества в полимер происходит на уровне физических взаимодействий, без образования прочных ковалентных связей.

3.1.5 Определение осмотической активности образцов геля

Учитывая принцип действия разрабатываемого геля, направленный на ранозаживление, одним из целевых профилей качества является наличие у состава ГЛФ высокой осмотической активности, обуславливающей быструю очистку раны от некротизированных тканей и раневого отделяемого.

Для изучения осмотической активности образцов №№ 1-9 использовали модифицированный метод Гунько В.Г., основанный на диализе через полупроницаемую мембрану [40].

В качестве полупроницаемой мембраны была использована повязка плёночная OPSITE FLEXIGRID 10x12 см (Smith&Nephew, Великобритания).

Диализатор состоял из стеклянного сосуда, закрытого крышкой, в котором укреплен полый цилиндр внутренним диаметром 55 мм. Дном цилиндра служила повязка плёночная (толщина пленки 0,25 мм). Первоначально на поверхность пленки равномерным слоем наносили 2,0 г (точная навеска) исследуемых образцов.

Цилиндр помещали в наружный сосуд, содержащий воду очищенную. Глубина погружения внутреннего цилиндра – 1,5 см [3].

Прибор помещали в термостат, в котором на протяжении всего опыта поддерживали температуру $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Через каждый час проводили взвешивание массы внутреннего цилиндра с навеской. Эксперимент вели до установления постоянной массы исследуемой системы.

В качестве контроля использовали гипертонический 13% раствор натрия хлорида [140]. Результаты эксперимента приведены в таблице 5.

Статистическая обработка данных $V \pm v$ (%) представлена в таблице 6.

Таблица 5 – Результаты эксперимента

Образец	№ пробы		
	1	2	3
1	20	30	20
2	10	10	15
3	25	15	20
4	30	28	29
6	35	30	40
7	10	15	20
8	10	10	20
9	15	25	15
Основа	30	29	30
NaCl	38	39	40

Таблица 6 – Статистическая обработка данных $V \pm v$ (%)

Образец	Объём, мл
1	23,33 ± 2,31
2	11,67 ± 1,15
3	20,83 ± 1,68
4	29,00 ± 3,05
6	35,00 ± 2,00
7	15,00 ± 2,00
8	13,33 ± 2,31
9	18,33 ± 2,31
Основа	29,66 ± 4,16
NaCl	39,67 ± 3,05

Для дальнейших исследований и разработки технологии получения геля был выбран образец № 6 (табл. 4) на основе 2% ГПМЦ, как наиболее полно отвечающий заявленным требованиям – пластическая вязкость образца ГЛФ на основе 2% ГПМЦ составила 1,0 Па·с, предел текучести 25,2 Па·с.

Состав выбранного образца приведен в таблице 7.

Следует обратить внимание на различие концентрации Хт в составе образца и в таблице. Но, поскольку Хт является составной частью двух разработанных фармацевтических субстанций комплекс хитозан-химопсин и комплекс хитозан-мирамистин, то его концентрация при включении в основу в ГЛФ составляет 2,0 г на 100 г препарата.

Таблица 7 – Состав препарата на 100 г

Действующие и вспомогательные вещества	Масса, г
Химопсин	0,20
Мирамистин	0,05
Лидокаин	0,10
Хитозан	2,00
Полиакриламид	0,10
Гидроксипропилметилцеллюлоза	2,00
Глицерин	5,00
Вода очищенная	до 100,00

3.1.6 Изучение процесса набухания полимерных пленок в зависимости от состава в различных модельных средах

С целью выбора пространства проектного поля для определения кинетики и полноты высвобождения физически иммобилизованных в полимере действующих веществ, изучали процесс набухания полимерных пленок в зависимости от состава в различных модельных средах.

Набухание является первым этапом процесса частичного или полного растворения полимерных пленок. Это самопроизвольный физический процесс, предшествующий их растворению.

Способность полимеров к набуханию оценивали по степени набухания, которая выражается количеством поглощенной полимером жидкости, отнесенной к единицам массы. Рассчитывая степень набухания полимерных пленок через определенные интервалы времени, получали кривые, которые характеризуют кинетику набухания [104].

Предельную величину набухания оценивали одновременно с процессом набухания и процессом растворения полимерных композиций. Объектами исследования являлись различные биополимеры, выбранные ранее с учетом технологии получения [104] композиций: полисахариды – ГПМЦ, Хт в водорастворимой форме; ПАА; а также смеси этих полимеров.

В качестве среды, в которой будет происходить набухание полимеров, были выбраны следующие модельные варианты:

- фосфатный буфер, **pH 7,0**, 1 М – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ в качестве модели крови человека, так как соответствует pH 7,0 крови человека;
- фосфатный буфер, **pH 6,0**, 1 М – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ с pH 6,0 в качестве модели раны;
- дистиллированная вода.

Из проведенных экспериментов (рис. 6) видно, что пленка ГПМЦ во всех изучаемых средах очень быстро адсорбирует жидкость [104]. Адсорбция жидкости происходит быстрее в дистиллированной воде, чем в физиологическом растворе.

Набухаемость ГПМЦ обусловлена изменением конформации макромолекул, осмотическим давлением противоионов, зависимостью от pH среды.

При выбранной модели внешней среды, наиболее активно процесс набухания пленки из ГПМЦ происходит в период от 2 до 30 мин, затем набухание на протяжении некоторого времени (от 30 до 45 мин) существенно не изменяется, а затем начинается деструкция и растворение полимера.

Степень набухания будет меняться также и от pH среды. На рисунке 7 видно, что степень набухания изменяется в зависимости от кислотных свойств среды, в которой происходит набухание [104]. Снижение pH, т.е. изменение pH среды в более кислую область, увеличивает степень набухания полимеров.

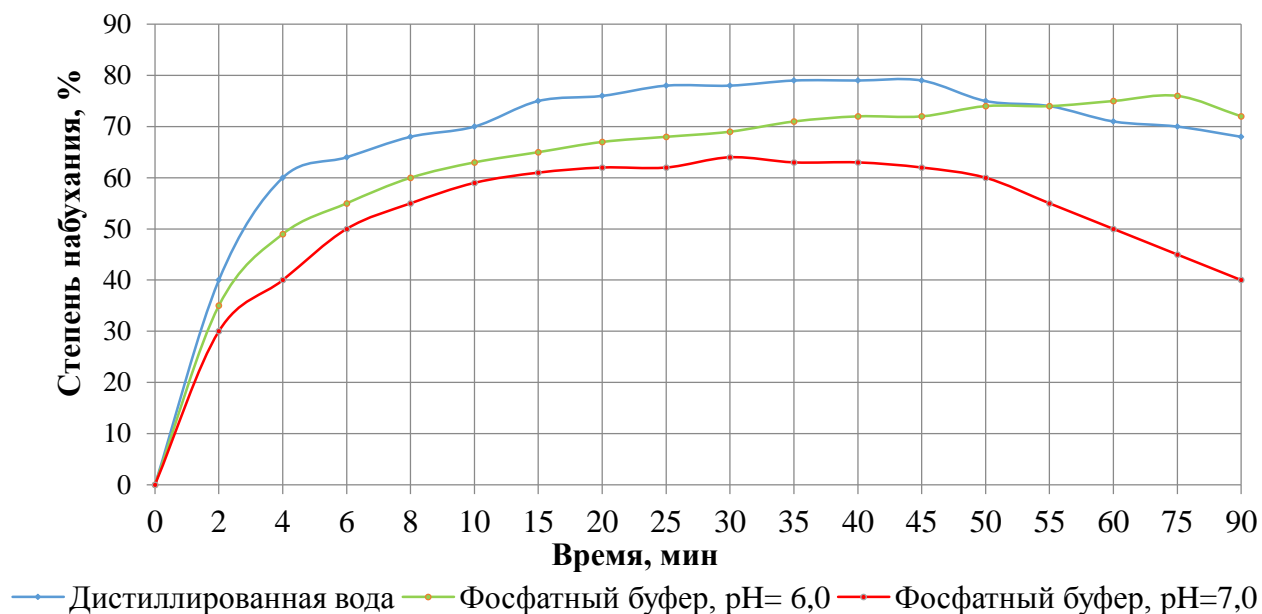


Рисунок 6 – Кинетические кривые набухания пленки ГПМЦ 2%

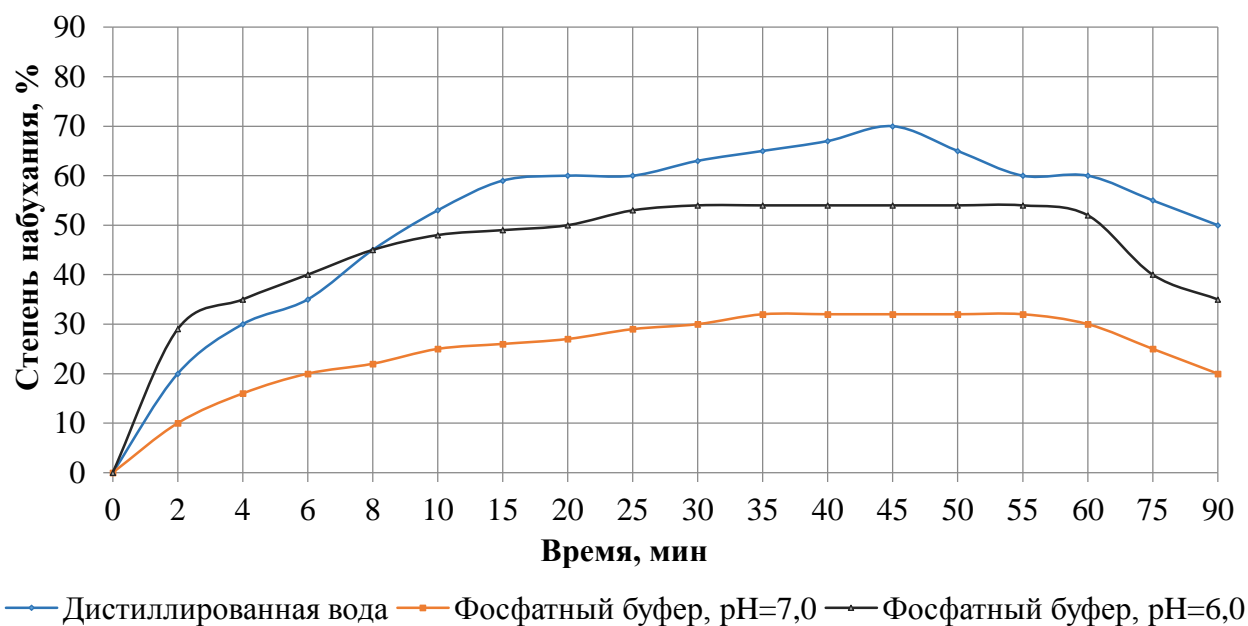


Рисунок 7 – Кинетические кривые набухания пленки Хт 2%

Степень набухания Хт (рис. 7) несколько меньше, чем у ГПМЦ. Это объясняется тем, что степень набухания Хт лимитируется в основном кристалличностью полимера [104].

Матрицы на основе смеси этих биополимеров медленнее набухают и растворяются, и, следовательно, дольше удерживают иммобилизованные в них действующие вещества. Это важно, когда необходимо регулировать скорость высвобождения действующих веществ для различных областей применения [104], которую можно варьировать количественным соотношением компонентов смесей.

Набухание пленок из ПАА также происходило быстро от второй до 30 минуты. Причем, процесс набухания всех полимеров происходил более интенсивно при повышенных температурах (рис.8).

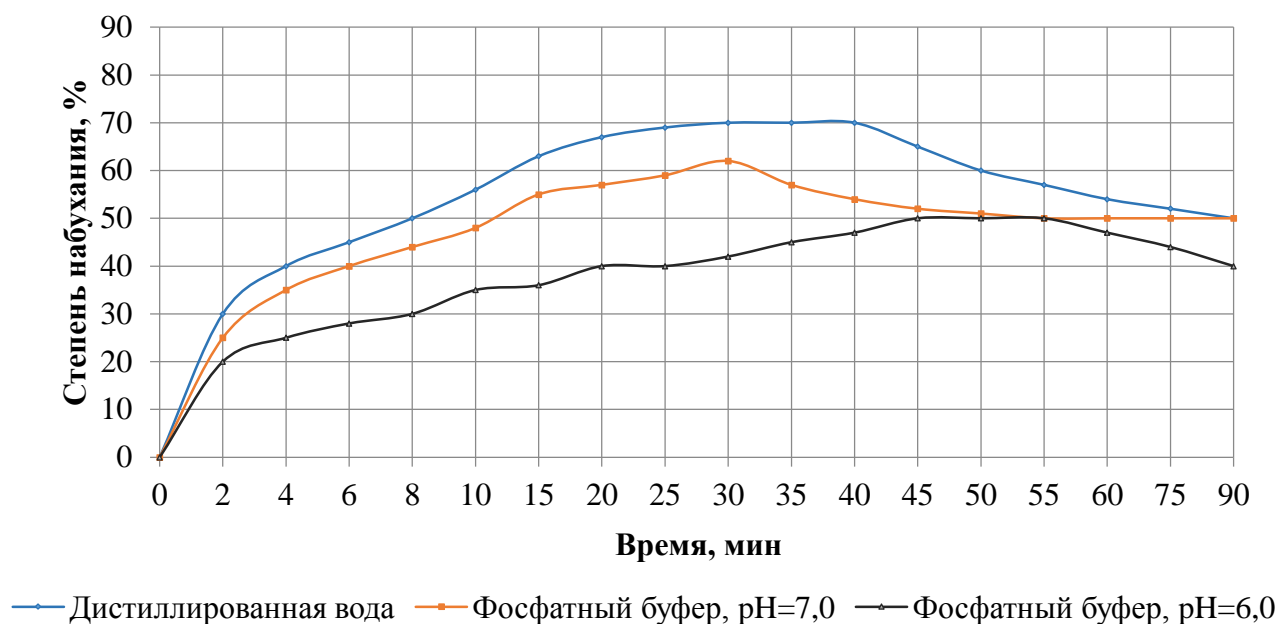


Рисунок 8 – Кинетические кривые набухания пленки из ПАА

Набухание пленок, состоящих из смеси полимеров ГПМЦ и ПАА, представлен на рисунке 9.

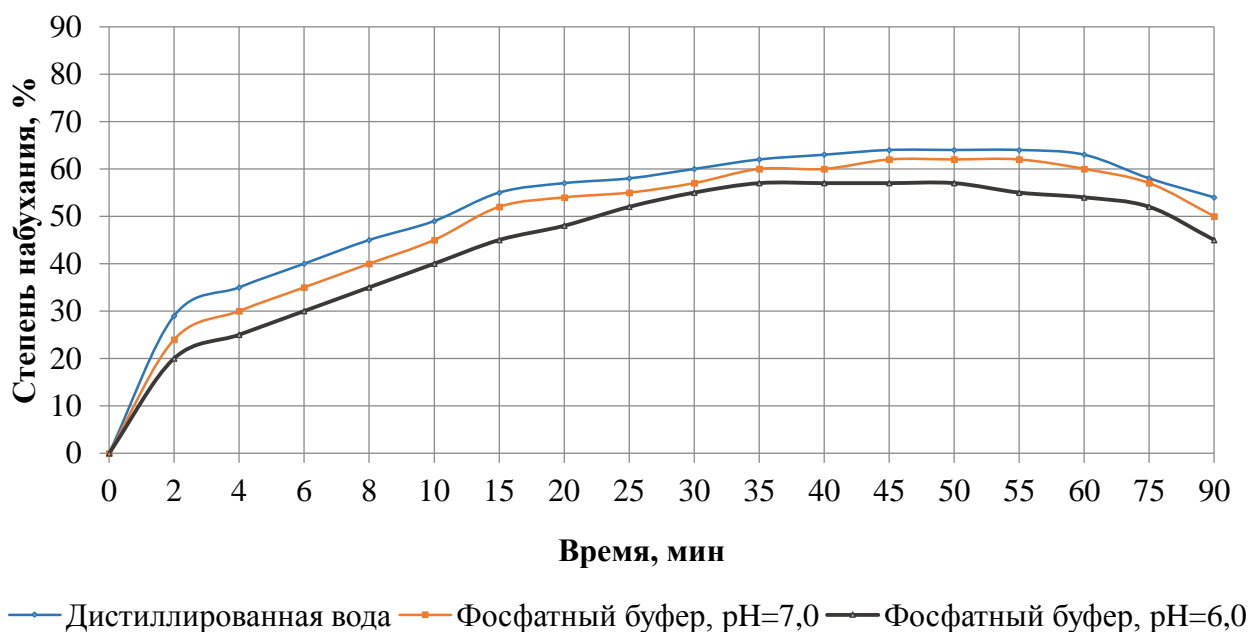


Рисунок 9 – Кинетические кривые набухания пленок из смеси полимеров ГПМЦ и ПАА

Варьируя соотношением компонентов смеси полимеров, можно изменять время растворения полимерной композиции и, соответственно, скорость и полноту высвобождения во внешнюю среду импрегнированных в полимерной пленке действующих веществ в целях использования пленок из смеси полимеров в качестве «депо» для обеспечения пролонгированного поступления действующих веществ в биологические ткани.

ГПМЦ – неограниченно набухающий полимер, обеспечивает смеси большую полноту и скорость набухания, частично переходящую в растворение [104]. ПАА, ограниченно набухающий во всех средах, снижает степень набухания смеси. Следовательно, содержание ПАА в основе должно быть небольшим по сравнению с ГПМЦ.

Далее изучалась кинетика набухания смеси Хт 2% и ГПМЦ 2% (рис. 10). Присутствие ГПМЦ увеличивало набухание, а Хт - время растворения пленки, изготовленной из смеси этих полимеров.

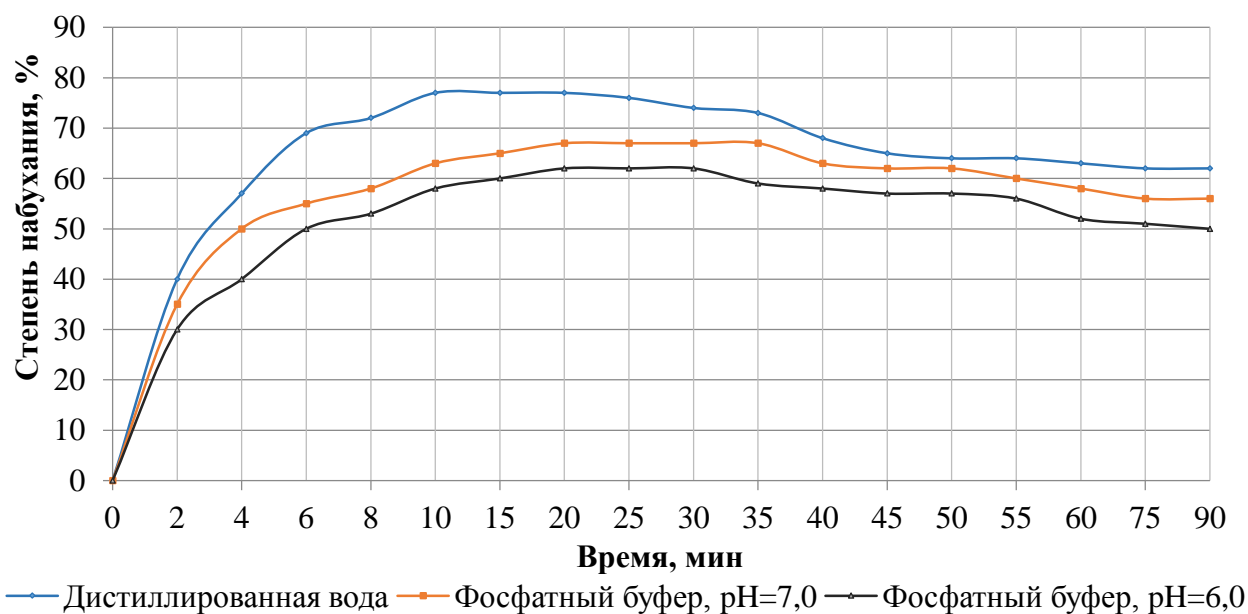


Рисунок 10 – Кинетические кривые набухания пленок из смеси полимеров ГПМЦ и Хт

Анализируя пленки из смеси полимеров ГПМЦ и ПАА, представленного на рисунке 9 и пленки из смеси полимеров ГПМЦ и Хт, представленного на рисунке 10, было сделано заключение, что набухание и растворение данных пленок происходит быстрее во втором случае и, следовательно, отвечало желаемым требованиям.

Из всех рисунков видно, что наиболее активно процесс набухания этих пленок происходил в начальный период (от 2 до 10 минут), затем набухание на протяжении некоторого времени (от 10 до 20 минут) не изменялось. Через некоторое время, после начала растворения

пленки происходило высвобождение действующих веществ из смеси этих полимеров, что приводило к быстрому высвобождению терапевтической дозы ГЛФ.

Пространство проектных параметров, определенное по общей области эффективных рабочих диапазонов для вязкости и набухания представлено на рисунке 11 и 12.

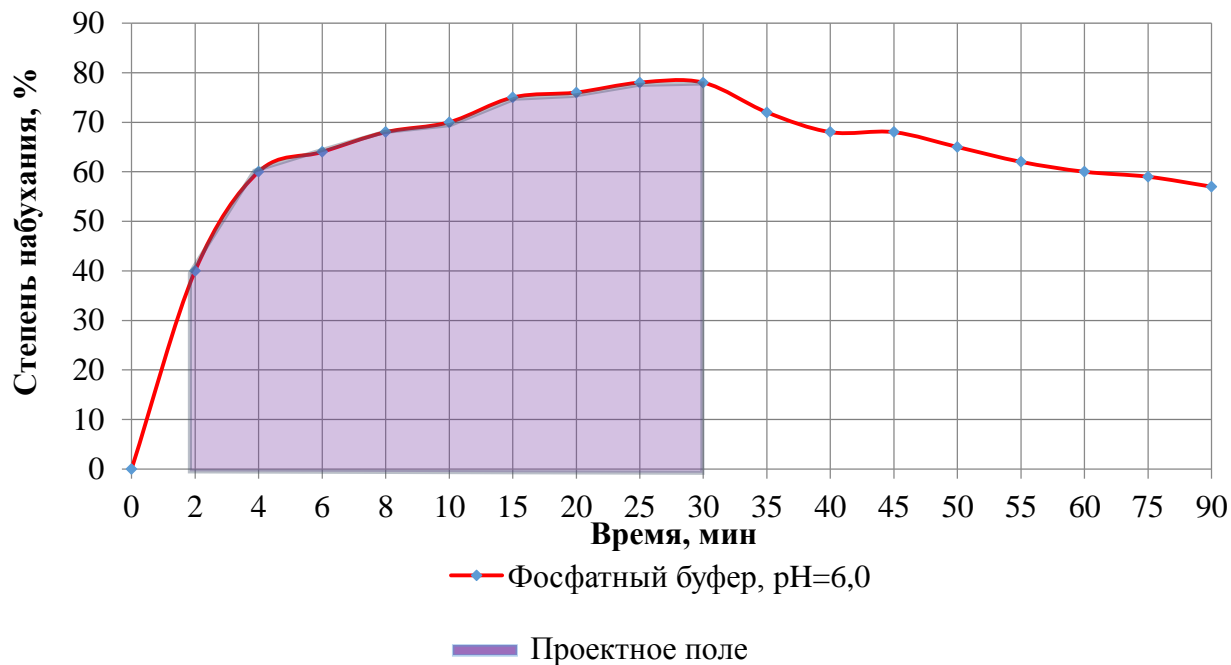


Рисунок 11 – Кинетическая кривая набухания пленки полимера

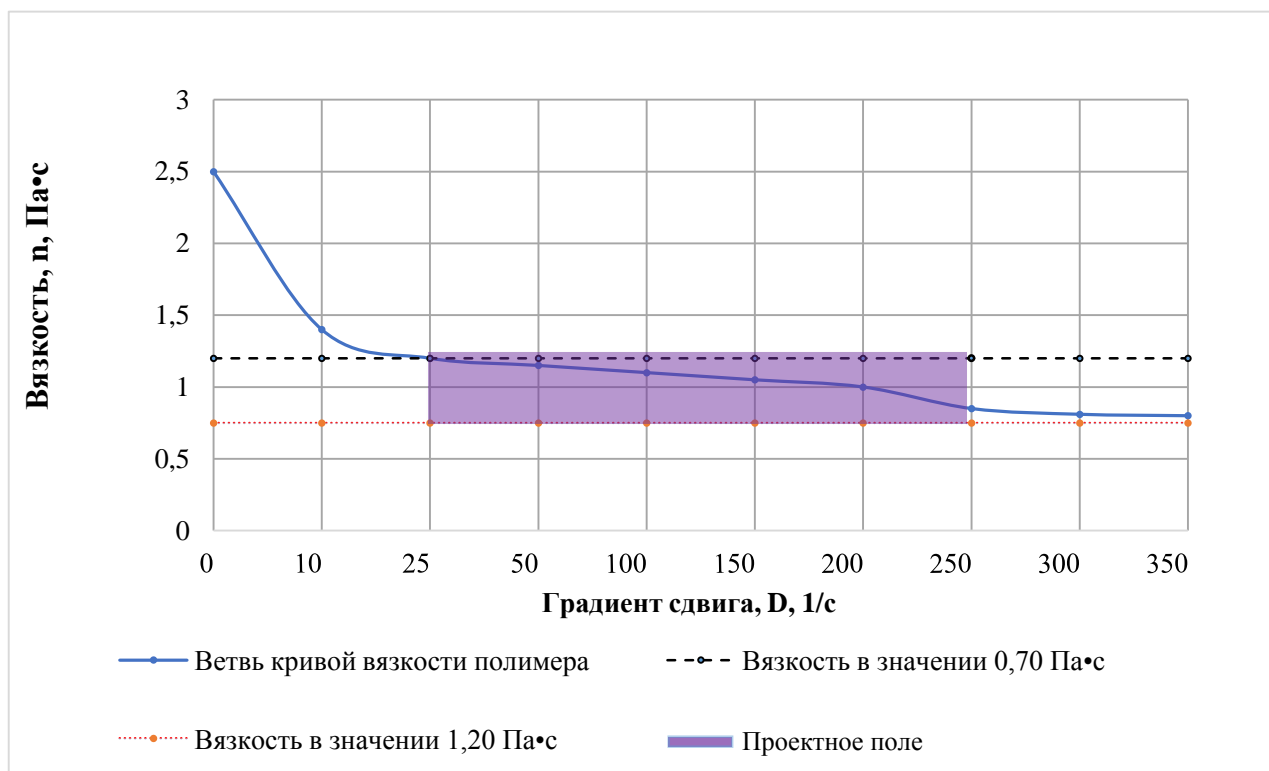


Рисунок 12 – Кривая вязкости от градиента скорости сдвига

Комбинация таких характеристик как состав и концентрация полимерной смеси, влияющие на процесс набухания и растворения пленок, позволяет создавать системы с различной скоростью растворения, и соответственно влияет на высвобождение импрегнированных в них действующих веществ.

Далее было решено процесс набухания пленок разделить на 2 стадии. Первая стадия – от 0 до 2 минут эксперимента, т.к. на всех графиках достаточно четко видно, что за этот период времени скорость набухания полимерных пленок резко возрастает, а последующее набухание протекает от 2 до 90 мин. Деление на стадии получилось следующим: I стадия от 0 до 2 мин, II стадия от 2 мин до 90 мин.

Объем внешней среды при этом не менялся. Сравнительный анализ скорости набухания изучаемых пленок представлен в таблице 8. Как видно из полученных данных, на первой стадии от 0 до 2 мин в начале процесса сорбции жидкости, ГПМЦ во всех средах набухает быстрее, чем на второй стадии. Пленка из Хт набухает медленнее, чем из ГПМЦ, скорость набухания пленки Хт ниже скорости набухания целлюлозной пленки.

Таблица 8 – Влияние pH среды на скорость набухания полимеров

Состав пленки полимера	Среда набухания	Участки кривой (Км, с ⁻¹)	
		I	II
ГПМЦ 2%	дистиллированная вода	13,66	4,05
	фосфатный буфер pH 6,0	12,57	4,40
	фосфатный буфер pH 7,0	10,88	3,04
Хт 2%	дистиллированная вода	8,27	3,91
	фосфатный буфер pH 6,0	9,15	3,00
	фосфатный буфер pH 7,0	5,08	1,54
ГПМЦ + Хт, 50:50	дистиллированная вода	11,25	6,21
	фосфатный буфер pH 6,0	9,30	5,21
	фосфатный буфер pH 7,0	7,66	4,51
ПАА	дистиллированная вода	9,19	4,95
	фосфатный буфер pH 6,0	8,31	4,55
	фосфатный буфер pH 7,0	7,27	3,84
ГПМЦ + ПАА, 10:1	дистиллированная вода	13,63	6,30
	фосфатный буфер pH 6,0	11,71	5,66
	фосфатный буфер pH 7,0	10,66	5,41

Введение в полимерную композицию Хт приводит к уменьшению скорости набухания бикомпонентной полимерной пленки, но на второй стадии ситуация изменяется: скорость набухания пленки из смеси полимеров больше, чем скорость набухания целлюлозной пленки. У

пленки, состоящей из смеси полимеров ГПМЦ и ПАА, на всех стадиях наблюдается не очень высокая скорость набухания. Это связано с тем, что ПАА ограниченно набухает во всех трех средах (рис. 8), но скорость набухания на первой стадии выше, чем на второй. Данное свойство было использовано для наших целей, т.е. применение данной смеси полимеров-гелеобразователей для использования в качестве гелеобразователей с целью получения ГЛФ приемлемо при низком содержании ПАА по сравнению с ГПМЦ. Если соотношение изменить, импрегнированные в полимерные пленки действующие вещества будут высвобождаться не полностью, так как будут удерживаться в ограниченно набухающим ПАА. Пленка, состоящая из смеси полимеров ГПМЦ и Хт, характерна тем, что на первой стадии (0-2 мин) скорость набухания практически, как и у целлюлозной на аналогичном участке кривой.

На второй стадии, у данной смеси полимеров самая высокая скорость набухания во всех средах по сравнению с остальными исследуемыми нами полимерами. Исходя из этого, можно сделать вывод о целесообразности применения изучаемых пленок полимеров и их смесей с точки зрения возможности использования в нужной нам области:

– ГПМЦ набухает быстрее остальных полимеров, и, находясь во всех смешанных пленках, обеспечивает высокую скорость набухания на первой стадии, т.е. в первые 2 мин;

– Хт обеспечивает смеси более медленное набухание и увеличение скорости набухания на второй стадии. Находящееся в полимерной пленке действующее вещество будет медленнее высвобождаться из смеси, т.е. вслед за первой порцией действующих веществ, выход которых обеспечивает ГПМЦ, действующие вещества будут выходить постепенно небольшими порциями и обеспечивать пролонгированное действие на очаг поражения;

– пленки из полимерной композиции ГПМЦ– Хт хорошо набухают во всех средах, кроме того, ГПМЦ обеспечивает смеси «ровное» набухание, т.е. скорость набухания на всех участках и во всех средах самая высокая по сравнению с другими полимерными композициями. Использование данной композиции из смеси ГПМЦ и Хт лучше других подходит для применения в лечении ран, т.к. может обеспечить быстрое поступление действующих веществ к очагу поражения за короткое время;

– ПАА медленно набухает на первой стадии процесса и ограниченно на второй, что позволяет, изменяя его количество в составе ЛП, влиять на процессы высвобождения лекарственных веществ, импрегнированных в полимерные пленки, и тем самым обеспечивать их пролонгированное действие.

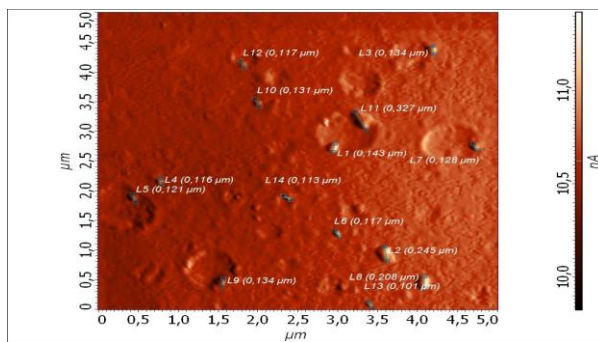
3.1.7 Исследование образцов методом атомно-силовой микроскопии

Для обеспечения однородности ГЛФ были проведены дополнительные исследования комбинированных фармацевтических субстанций с целью изучения изменения поверхности

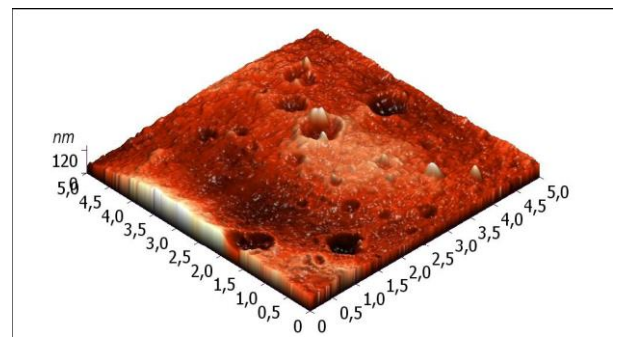
самого ХТ, а также комплексов на его основе хитозан–химопсин и хитозан–мирамистин и тройной композиции.

Максимально возможную информативность дает атомно-силовая микроскопия АСМ. Исследования методом атомно-силовой микроскопии выполнены на АСМ NT-MDT (рис. 13-16), для четырех образцов пленок:

- «ХТ»;
- «хитозан+химопсин»;
- хитозан+мирамистин»;
- «хитозан+химопсин+мирамистин».

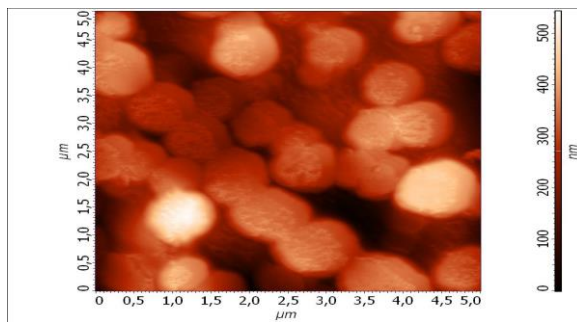


А

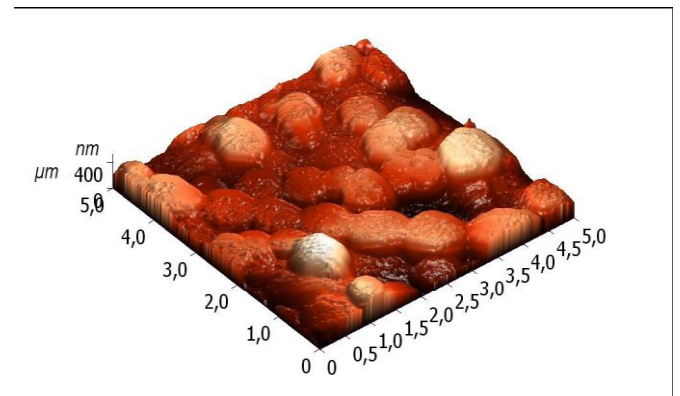


Б

Рисунок 13 – А. АСМ образца «ХТ» 5х5 мкм;
Б. 3D АСМ образца «ХТ» 5х5 мкм



А



Б

Рисунок 14 – А. АСМ образца «хитозан+химопсин» 5х5 мкм;
Б. 3D АСМ образца «хитозан+химопсин» 5х5 мкм

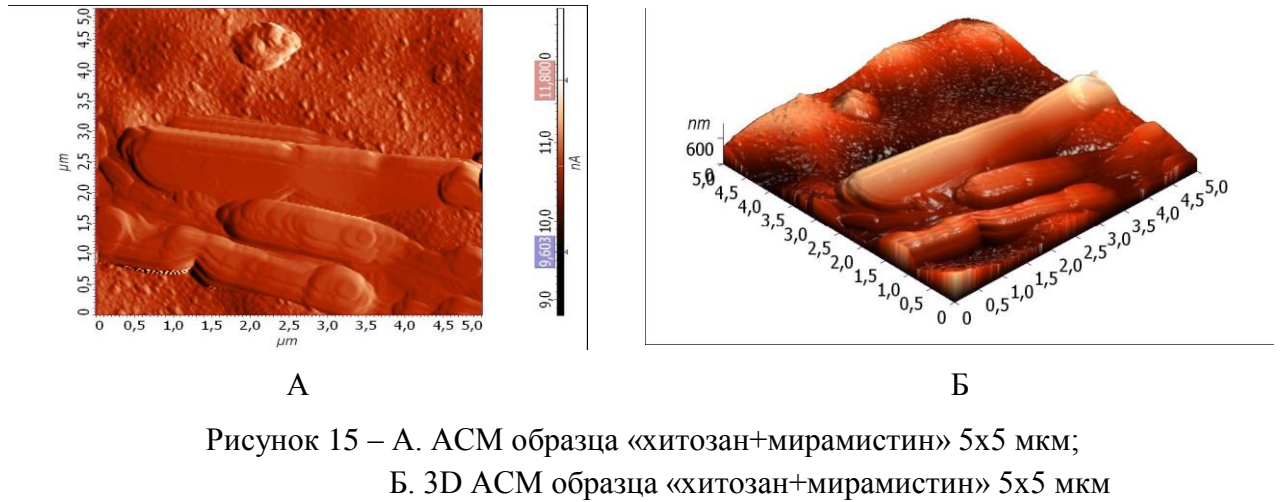


Рисунок 15 – А. АСМ образца «хитозан+мирамистин» 5х5 мкм;
Б. 3D АСМ образца «хитозан+мирамистин» 5х5 мкм

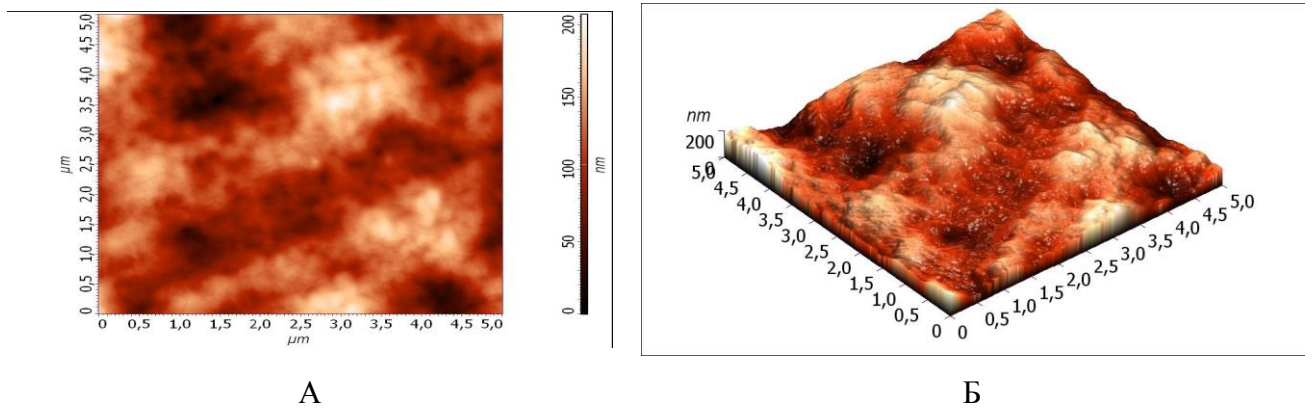


Рисунок 16 – А. АСМ образца «хитозан+химопсин+мирамистин» 5х5 мкм;
Б. 3D АСМ образца «хитозан+химопсин+мирамистин» 5х5 мкм

Полученные изображения, приведенные на рисунках 13–16, позволяют увидеть особенности поверхности исследуемых образцов.

Так как выбранная ГЛФ относится к гидрогелям, то в качестве гидрофильного неводного растворителя фармакопея рекомендует использовать глицерин, который также придает эластичность композиции.

Было проверено влияние глицерина методом атомно-силовой микроскопии, в частности, на Хт, который является носителем химопсина и мирамистина в фармацевтических субстанциях.

На рисунке 17 представлены данные АСМ для пленок Хт, содержащих и не содержащих глицерин.

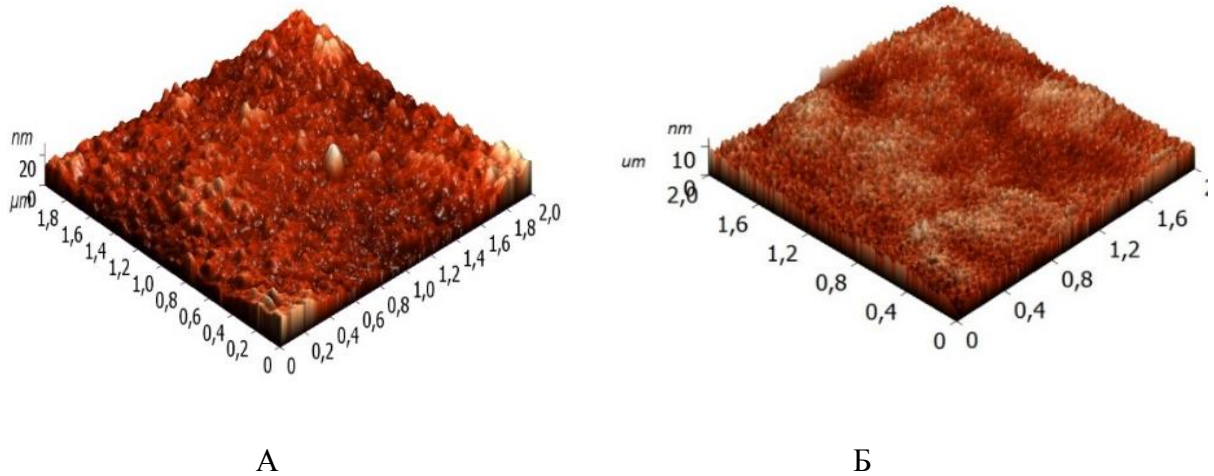


Рисунок 17 – А. 3D АСМ «Хт»;
Б. 3D АСМ «Хт – глицерин»

При наличии глицерина в составе смеси в Хт происходит упорядочивание структуры, и наблюдается отсутствие конгломератов Хт.

Молекула Хт имеет диаметр (гидродинамический радиус) от 0.515 нм (структурная единица - глюкозамин) до 90 нм (м.м около 500 kD). Увеличение концентрации глицерина в Хт не приводит к уменьшению ферментативной активности химопсина, а при больших концентрациях (более 50% масс.) глицерина, даже ведет к ее увеличению. Полученные данные могут быть объяснены образованием аддуктов Хт - глицерин (рис. 18).

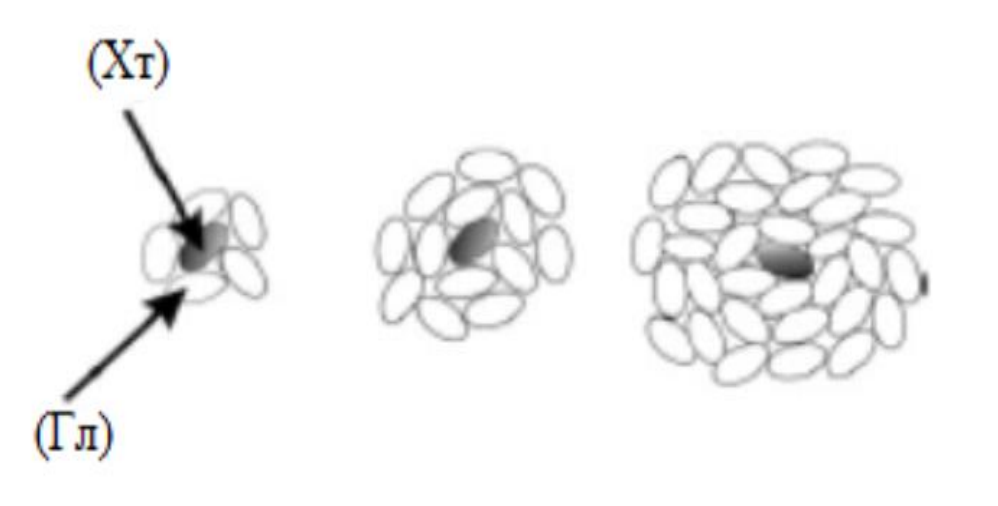


Рисунок 18 – Схема образования аддуктов Хт -глицерин

3.1.8 Определение протеолитической активности химопсина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

С целью определения целевого профиля качества, определяющего клиническое применение препарата, изучали протеолитическую активность. При оценке протеолитической активности был осуществлен выбор субстрата. Использовались три субстрата – азоколл, казеин и паранитроанилиду N-бензоил-D, L-аргинина (ВАрНА).

Было установлено, что определение активности по азоколлу является простым, быстрым, точным, но неспецифическим методом анализа. Однако флуоресцентный метод регистрации продукта ферментативной реакции имеет ряд ограничений. Так, при определении активности ферментов в неочищенных биологических объектах флуоресценция продукта может маскироваться содержащимися в них тушителями или флуоресценцией самой среды. Таким образом, каждый тип синтетических субстратов имеет свои достоинства и ограничения.

Казеин является жидким субстратом, характеризующим общую протеолитическую активность всех ферментов, входящих в состав ферментного комплекса. Поскольку химопсин состоит из трипсина и химотрипсина, в данном случае общая протеолитическая активность складывается из активности трипсина и химотрипсина, осуществляющих полный гидролиз. Наиболее оптимальным субстратом для определения протеолитической активности геля, содержащего химопсин, является казеин, позволяющий адекватно оценить данный вид специфической активности.

Данная методика устанавливает определение протеолитической активности белка в комбинированных медицинских препаратах с иммобилизованными ферментами и ферментными комплексами, такими как химопсин, химотрипсин, трипсин коллагеназа, эластаза, проназа и другими протеазами. Данная методика является модификацией метода Kunitz M. et. Al [14]. Метод основан на гидролизе казеина по Гаммерстону исследуемым ферментным препаратом до пептидов и аминокислот с последующим их определением.

В качестве субстрата используют 2% раствор казеина по Гаммерстону (MP Biochemicals, 0210128901) в 0,1М растворе фосфатного буфера, рН 8,0.

Была подобрана навеска геля, оптимальная для проведения реакции. Для определения берут три аналитические пробы испытуемого раствора объемом 0,2 г – две опытные и одна – контрольная.

В процессе проведения анализа используется центрифугирование (после остановки реакции путем добавления кислоты трихлоруксусной. Через 15 мин раствор подвергают центрифугированию при 20 °С в течение 20 минут при 14000 оборотах/мин, в фильтрате спектрофотометрически определяют оптическую плотность при длине волны 280±2 нм в кювете толщиной 10 мм. В отличие от раствора фермента, раствор на основе геля необходимо

центрифугировать, а не фильтровать через фильтровальную бумагу, т.к. частички геля забивают бумагу и не дают возможности фильтрации.

За единицу протеолитической активности принимают количество фермента, которое за 1 мин при 37 °С катализирует переход в неосаждаемое 5 % трихлоруксусной кислоты состояние такого количества казеина, которое содержит 1 мкМоль тирозина [14].

Протеолитическая активность геля была не менее $2,0 \pm 0,5$ ПЕ/г химопсина.

3.1.9 Определение антимикробной активности мирамистина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

Для обеспечения антимикробного действия в состав комплекса хитозан-мирамистин входит мирамистин, который обладает выраженным бактерицидным действием в отношении аэробных и анаэробных бактерий, грамположительных (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracoides*) и грамотрицательных организмов (*Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella*), как в виде монокультур, так и в виде ассоциаций (синегнойная палочка и стафилококк, эшерихии и стафилококки), включая госпитальные штаммы [72].

Исследование наличия бактериостатического/антисептического и противогрибкового действия у исследуемых образцов проводилось на различных бактериологических и грибковых культурах для выявления широты спектра действия.

Для исследования использовались образцы разработанного ранозаживляющего геля с различным содержанием мирамистина, в качестве контроля использовалась основа без действующих веществ, препарат сравнения – мазь левомеколь (табл. 9).

Использовались культуры:

Staphylococcus aureus (золотистый стафилококк) – вид шаровидных грамположительных бактерий из рода стафилококков.

Escherichia coli (кишечная палочка) – вид грамотрицательных палочковидных бактерий.

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) – вид грамотрицательных подвижных палочковидных бактерий.

Enterobacter aerogenes (энтеробактериям) – вид грамотрицательных палочкообразных перитрихальных спорообразующих бактерий.

Candida albicans (кандида) – диплоидный грибок (форма дрожжеподобных грибов).

Таблица 9 – Обобщённая таблица статистической обработки размеров зон подавления роста микробиологических культур, $D \pm d$ (мм)

Образец	Культура				
	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Гель: Мирамистин - 0,01 Химопсин - 0,2 Лидокаин - 0,1 ГПМЦ - 2,0 Хт - 2,0 ПАА - 0,1 Глицерин - 5,0 Вода - до 100,0	14,25±0,60	17,44±0,75	19,62±0,33	16,55±0,85	15,43±0,52
Гель: Мирамистин - 0,025 Химопсин - 0,2 Лидокаин - 0,1 ГПМЦ - 2,0 Хт - 2,0 ПАА - 0,1 Глицерин - 5,0 Вода - до 100,0	17,83±0,52	19,67±0,64	21,67±0,46	17,67±1,00	16,67±0,46
Гель: Мирамистин - 0,05 Химопсин - 0,2 Лидокаин - 0,1 ГПМЦ - 2,0 Хт - 2,0 ПАА - 0,1 Глицерин - 5,0 Вода - до 100,0	25,33±0,23	25,33±0,78	25,33±0,54	16,67±0,83	23,83±0,66
Гель: Мирамистин - 0,1 Химопсин - 0,2 Лидокаин - 0,1 ГПМЦ - 2,0 Хт - 2,0 ПАА - 0,1 Глицерин - 5,0 Вода - до 100,0	25,66±0,47	25,70±0,23	26,16±0,02	17,33±0,23	23,33±0,46
Левомеколь (мазь)	-	19,00±1,81	17,50±1,52	16,83±1,48	15,5±1,62
Основа - ГПМЦ, Хт, ПАА, глицерин, вода	-	-	-	-	-

Эксперимент проводился в стерильном боксе. В чашки Петри вносилось по 10 мл мясопептонного агара (плотная питательная среда для культивирования микроорганизмов, стерильный). После остывания питательной среды на её поверхность производился посев по методу Дригальского.

Далее в питательной среде вырезались лунки, в которые вносились исследуемые образцы. Твёрдый лиофилизат 10 мг (точная навеска) предварительно растворяли в пробирке в объёме воды, необходимом для сопоставления составов по количеству действующих веществ, и оставляли на 30 мин. Жидкие гели и растворённый лиофилизат и препарат сравнения вносили в лунки автоматической пипеткой по 0,04 мл. Все чашки Петри помещали в термостат на 24 часа при температуре 37 °С. После инкубации измеряли диаметры зон подавления роста бактерий и грибов и результаты вносили в журнал исследования. Лучшие результаты получены при использовании в составе геля 0,05 и 0,10% мирамистина. Антимикробный эффект геля, содержащего 0,10% мирамистин, незначительно превосходит эффект геля с 0,05% мирамистином. Кроме того, следует учитывать высокую стоимость мирамистина, а также стремиться к минимизации лекарственной нагрузки на организм пациента, поэтому был выбран образец ГЛФ с содержанием мирамистина 0,05%.

Также был проведен эксперимент с использованием 96-луночного планшета, для подтверждения индеферентности химопсина на антибактериальную активность мирамистина. В питательную среду (L бульон) вносили инокулят культуры и инкубировали на термостатируемом шейкере Thermo-Shaker PST-60HI-4, BioSan, при 320 об/мин, при 37 °С в течение 24 часов. Полученную культуру клеток разбавляли в 1000 раз. В лунки планшета вносили 20µl культуры *St.aureus*, 80µl стерильной питательной среды (L бульон) и 100 µl препаратов. Через каждые 2 часа проводили измерения оптической плотности при длине волны 505 нм на спекрофотометре для микропланшетов iMark фирмы Bio-Rad Lab. Inc. USA в течение 24 часов [55]. Полученные данные свидетельствуют о том, что комплекс хитозан-мирамистин обладает антимикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus*. Введение фермента в систему хитозан-мирамистин не влияет на антибактериальные свойства мирамистина.

3.2 Оценка показателей качества ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

Оценку показателей качества ГЛФ проводили согласно ОФС.1.4.1.0008.18 «Мази», рН водного извлечения определяли согласно методике, приведенной в ГФ РФ [6].

Агрегативную устойчивость гелей определяли методом центрифугирования по величине коэффициента кинетической стабильности.

Реологические свойства ГЛФ «Гель ранозаживляющий» определяли на ротационном вискозиметре (Rheotest RN4.1, Германия) с программным обеспечением в измерительной системе типа «цилиндр в цилиндре» ms din 33 и ms din 11 (объем ячейки 17 и 32 мл соответственно), при температуре (20±1) °С, в диапазоне изменения градиента скорости сдвига от 5 до 300 с⁻¹ [6]. Эффективная вязкость должна быть в интервале от 0,70 до 1,20 Па·с. Динамическую вязкость изучали по системе «малый сдвиг-большой сдвиг-малый сдвиг» в двух диапазонах скоростей сдвига от 0 до 10 с⁻¹ и от 0 до 300 с⁻¹. Аналитические диапазоны скоростей

сдвига рассчитывались по средним градиентам скоростей сдвига, соответствующим условиям производства и применения ЛП [6].

Определение подлинности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» по химопсину определяли по створаживающему действию на растворы молока. Основное оборудование: термостат с прозрачными стенками (ТПС, СлавМедТехника, Россия). Время створаживания химопсина для ЛС должно быть не более 50 сек.

Протеолитическую активность ГЛФ «Гель ранозаживляющий», действующим веществом которого является комплекс хитозан–химопсин, определяли гидролизом ферментным препаратом казеина по Гаммерстену до пептидов и аминокислот с последующим их определением. Основное оборудование: UV-Vis-спектрофотометр (Shimadzu UV-2600, Япония) с термостатируемой кинетической ячейкой (ТСС-240А), ИК-Фурье спектрометр (Nicolet 380, Thermo Scientific, США). Протеолитическая активность геля должна быть не меньше $2,0 \pm 0,5$ ПЕ/г геля.

Для определения антимикробного действия мирамистина использовалась культура *Staphylococcus aureus*, которая преобладает в микрофлоре инфицированной раневой поверхности. Подсчет клеток микроорганизмов производился по методу Коха ($\text{КОЕ} = 1,8 \cdot 10^4$ кл/мл). Исследование было проведено методом «колодцев». В качестве плотной питательной среды был использован L-агар, в котором делали лунки диаметром 8 мм, в которые помещали исследуемые растворы (0,1мл). Культура микроорганизмов была разведена до 10^6 КОЕ в 1 мл. После засева чашки Петри инкубировали в течение 2 дней при температуре 37 °С. После чего была проведена оценка, критерием которой являлась зона задержки роста микрофлоры: до 10 мм или ее отсутствие – микроорганизмы не чувствительны к препарату; 11-15 мм – обладали малой чувствительностью и более 15 мм чувствительные штаммы.

Для изучения характеристик поверхности был использован атомно-силовой микроскоп Ntegra Prima (NT-MDT, Россия), который был оснащен сканером и кремниевым кантелевером НА-NC Etalon (длина консоли 124 мкм, силовая константа 3,5 Н/м, резонансная частота 140 кГц, радиус закругления иглы менее 10 нм в соответствии с производственной спецификацией) [53].

Качественное и количественное определение мирамистина и лидокаина в ГЛФ проводили методом ВЭЖХ. Основное оборудование: Хроматограф жидкостный (Agilent, США) снабженный УФ-детектором (MWD, зав. № DE64256455; DAD, зав. № DE64262550); колонка из нержавеющей стали размером 150 x 4,6 мм, заполненная сорбентом C18 (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, США), с размером частиц 5 мкм или аналогичная.

Содержание мирамистина в ГЛФ от 95 до 105% от заявленного количества.

Содержание лидокаина в ГЛФ от 95 до 105% от заявленного количества. При валидации методик были определены следующие показатели: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, повторяемость.

3.3 Система упаковки (укупорки)

Выбор упаковки является одной из важнейших составных частей и функций технологического процесса производства ЛП. Функциональное значение упаковки не ограничивается только сохранностью, а должно подразумевать достижение и других целей, таких как удобство пользования ЛП, возможность дозированного применения, микробиологическую чистоту и(или) стерильность, контроль первого вскрытия упаковки, недоступность для вскрытия ее детьми и др. Ввиду непосредственного контакта с готовой формой наиболее важным является качество первичной упаковки.

В качестве первичной упаковки для ГЛФ «Гель ранозаживляющий» были выбраны тубы AVL с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой, обладающие значительной химической инертностью, высокой прочностью и устойчивостью к перепадам температуры. Выбор первичной упаковки обуславливается следующими условиями: светонепроницаемость, барьер против выделения наружу действующих веществ, стойкость материала, инертность по отношению к содержимому, простота в использовании, свидетельство целостности упаковки, отсутствие всасывающего эффекта.

Материал, используемый для производства туб – многослойный комбинированный, состоящий из барьерного слоя (в середине), внешнего и внутреннего полиэтиленовых слоев, а также двух адгезионных слоев (они связывают вместе три основных). Ламинат надежно защищает содержимое тубы от проникновения бактерий, воды, кислорода и света (AVL).

Неоспоримым преимуществом туб перед другими видами упаковки является их компактность, герметичность и высокие барьерные свойства. Туба позволяет точно дозировать содержимое без дополнительных приспособлений, обеспечивает длительные сроки хранения и удобна в использовании.

Выводы к главе 3

1. Осуществлен подбор вспомогательных веществ с учетом их физико-химических свойств. Показано, что выбранные вспомогательные вещества могут оказать влияние на действие ЛП (устойчивость, биодоступность). Выбрана полимерная основа для ГЛФ с учетом планируемого использования ЛП для лечения инфицированных ран. Изучена осмотическая активность исследуемых образцов из которых выбран наиболее полно отвечающий заявленным

требованиям. Изучение процесса набухания полимерных пленок показало, что наилучшими свойствами, с точки зрения применения в купировании раневого процесса, обладают полимерные композиции из ГПМЦ и ХТ с небольшим количеством ПАА. Изучение реологических свойств образцов ГЛФ позволило выбрать в качестве модификатора вязкости основу с применением 2% ГПМЦ. Однородность ГЛФ была исследована с использованием метода атомно-силовой микроскопии.

2. С целью выбора показателей, которые должны обеспечить желаемое качество лекарственного препарата при его производстве, оценивали некоторые критические характеристики качества ГЛФ: внешний вид, рН водной вытяжки, вязкость, подлинность, микробиологическую чистоту.

3. Обоснован и разработан состав ЛП «Гель ранозаживляющий» на основе фармацевтических субстанций комплексов хитозан-химопсин и хитозан-мирамистин.

4. Обоснован выбор упаковки ЛП «Гель ранозаживляющий». В качестве первичной упаковки выбраны тубы AVL.

ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ «ГЕЛЬ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ» НА ОСНОВЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ КОМПЛЕКСА ХИТОЗАН – ХИМОПСИН И КОМПЛЕКСА ХИТОЗАН – МИРАМИСТИН

4.1. Разработка технологии получения ГЛФ

В соответствии с требованиями ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» [28] подход к разработке производственного процесса с проектированием качества готового продукта дополнительно включает оценку, понимание и корректировку (при необходимости) состава и производственного процесса, включая:

- определение посредством использования ранее полученных знаний и экспериментов в рамках пространства проектных параметров характеристик и параметров процесса, которые могут влиять на критические характеристики качества ЛП;
- определение функциональной связи критических характеристик качества с производственным процессом;
- выбор надлежащего производственного процесса;
- определение стратегии контроля.

В соответствии с требованиями Модуля 3 «Качество» Общего технического документа в регистрационном досье приводятся следующие данные на ЛП:

- 3.2. Р.1. Описание и состав ЛП;
- 3.2.Р.2. Фармацевтическая разработка;
- 3.2. Р.3. Процесс производства ЛП;
- 3.2.Р.4. Контроль качества вспомогательных веществ;
- 3.2. Р.5. Контроль качества ЛП;
- 3.2.Р.6. Стандартные образцы и материалы;
- 3.2.Р.7. Система упаковки (укупорки);
- 3.2. Р.8. Стабильность ЛП.

С целью описания процесса производства ЛП необходимо представить:

- описание способа производства ЛП: принцип процесса производства, вид используемого оборудования, технологические параметры;
- критические параметры процесса, требующие мониторинга или контроля.

В технологии мягких лекарственных форм наиболее важными являются следующие факторы: способ введения действующих веществ в основу, время, скорость и порядок смешивания компонентов основы, температурный режим процесса. Они влияют на

консистенцию, реологические свойства, однородность, стабильность при хранении и фармакологическую эффективность.

Для завершения исследований по разработке состава и технологии геля ранозаживляющего был разработан опытно-промышленный регламент (ОПР) получения ГЛФ «Гель ранозаживляющий» для наружного применения.

ОПР - технологический документ, которым завершается отработка новой технологии производства лекарственного средства на опытно-промышленной установке. ОПР используется для изготовления и испытания опытных образцов нового лекарственного средства в полупроизводственных условиях, отработки качественных показателей новой продукции, вводимых в нормативную документацию. Требования ОПР должны обеспечивать заданное качество выпускаемой продукции, оптимальный технологический режим, рациональное использование материальных, топливно-энергетических и трудовых ресурсов, правильную эксплуатацию и сохранность оборудования, исключение возможности возникновения аварий и загрязнения окружающей среды, безопасность ведения производственного процесса.

Разработанный ОПР получения ГЛФ «Гель ранозаживляющий» оформлен в соответствии с ОСТ 64-02-003-2002 и включает следующие разделы:

1. характеристика готового продукта;
2. химическая схема производства;
3. технологическая схема производства;
4. аппаратная схема производства и спецификация оборудования;
5. характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов;
6. изложение технологического процесса;
7. материальный баланс;
8. переработка и обезвреживание отходов производства;
9. контроль производства;
10. безопасная эксплуатация производства;
11. охрана окружающей среды;
12. перечень производственных инструкций;
13. технико-экономические нормативы;
14. информационные материалы.

Технологический процесс получения ГЛФ состоит из следующих стадий: получение геля, фасовка, упаковка и оценка качества ГЛФ.

Получение геля начинали с подготовки действующих веществ и основы. В операцию подготовки основы входил процесс растворения и набухания.

В производственную емкость отмеривали рассчитанное количество воды очищенной, предварительно подогретой до 60-65 °С. Порошок ГПМЦ, взвешенный на аналитических весах, рассеивали по поверхности воды и оставляли в течение 5-6 часов для набухания и исчезновения комочков, затем систему перемешивали с помощью пропеллерной мешалки до получения гомогенной структуры. После этого при постоянном перемешивании добавляли ПАА с предварительно растворенным в нем анестетиком лидокаином. Введение еще одного гелеобразующего агента приводило к загущению системы и повышало степень вязкости.

Лиофилизаты комплексов хитозан-химопсин и хитозан - мирамистин, предварительно растворив в воде, добавляли в основу. Ингредиенты тщательно гомогенизировали с помощью высокоскоростной мешалки.

Оставляли до полного завершения гелеобразования в течение 24 часов для удаления пузырьков воздуха (дегазация) (рис. 19).

1. Характеристика готового продукта



Рисунок 19 – Внешний вид ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

Наименование продукции: «Гель ранозаживляющий».

Категория продукции: ГЛФ с комплексной терапевтической активностью. Действующими веществами являются: комплекс хитозан-химопсин, комплекс хитозан-мирамистин и лидокаин.

ГЛФ «Гель ранозаживляющий» – гомогенный гель молочно-белого цвета, без запаха, без механических включений, нежирный на ощупь. При использовании легко наносится на рану, плотно прилегая к поверхности кожи.

Фармакотерапевтическая группа: антисептики и дезинфицирующие средства; местные анестетики; ферменты и антиферментные препараты

Код АТХ: D06C

Основное назначение продукции: ГЛФ «Гель ранозаживляющий» предназначен для наружного применения для очищения и лечения инфицированных, гнойно-некротических ран различного генеза.

Комплекс хитозан-химопсин представляет собой комбинированную фармацевтическую субстанцию ферментного препарата протеолитического действия – химопсина и высокомолекулярного полисахарида природного происхождения – хитозана кислоторастворимого.

Действующим веществом комплекса является ферментный препарат химопсин, который обеспечивает ферментативное очищение раны от гнойно-некротических масс за счет лизиса денатурированных белков.

Комплекс хитозан-мирамистин представляет собой фармацевтическую субстанцию, содержащую в качестве активного вещества антибактериальный препарат мирамистин, который оказывает пролонгированное бактерицидное и фунгицидное действие.

Ферментный комплекс химопсин и антибактериальный препарат мирамистин иммобилизованы в структуру Хт за счет образования водородных связей и сил Ван-дер-Ваальса.

Анестетик лидокаин, распределенный в полимерной матрице ПАА путем включения в пространственную структуру готового полимера, оказывает анестезирующее действие и ослабляет болевой эффект.

В состав ГЛФ входят вспомогательные вещества: гелеобразователи ГПМЦ и ПАА, глицерин для придания эластичности системе и вода. Состав ГЛФ на одну тубу представлен в таблице 10.

Таблица 10 – Состав ГЛФ на одну тубу (30 г)

Состав	Масса, г
Действующие вещества	
Комплекс хитозан–химопсин, в том числе:	0,450
химопсин	0,060
Комплекс хитозан–мирамистин, в том числе:	0,420

мирамистин	0,015
Лидокаин	0,030
Вспомогательные вещества	
Гидроксипропилметилцеллюлоза	0,600
Полиакриламид	0,030
Глицерин	1,500
Вода	до 30,000

Упаковка:

ГЛФ «Гель ранозаживляющий» упаковывают в тубы, вместимостью 30,0 г (тубы АВL, диаметр тубы - 25 мм), с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой. Каждую тубу вместе с инструкцией по применению помещают в картонную пачку.

Маркировка:

На тубу наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или бумаги писчей по ГОСТ 18510-87. На этикетке тубы хорошо читаемым шрифтом на русском языке указаны наименование ЛП, номер серии, срок годности, количество.

На картонной пачке хорошо читаемым шрифтом на русском языке указаны наименование ЛП, наименование производителя, номер серии, номер регистрационного удостоверения, срок годности, способ применения, количество, лекарственная форма, условия отпуска, условия хранения, предупредительные надписи.

Транспортирование:

Картонные пачки с ГЛФ «Гель ранозаживляющий» упаковываются в картонные коробки в соответствии с ГОСТ 17768-90 («Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение»).

Транспортирование осуществляется в соответствии с Правилами надлежащей практики хранения и перевозки ЛП для медицинского применения (приказ Минздрава России от 31.08.2016 г. № 646н).

Хранение:

в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности:

2 года.

2. Химическая схема производства

Химических превращений в процессе получения ГЛФ «Гель ранозаживляющий» не

происходит.

3. Технологическая схема производства

Технологическая схема производства наглядно отображает последовательность выполнения работ в данном производстве с подразделением их по стадиям и операциям технологического процесса, указанием основных материальных потоков (поступление сырья, химикатов, получение промежуточных продуктов) и мест образования отходов, потерь, систем очистки и утилизации (рис. 20).

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА

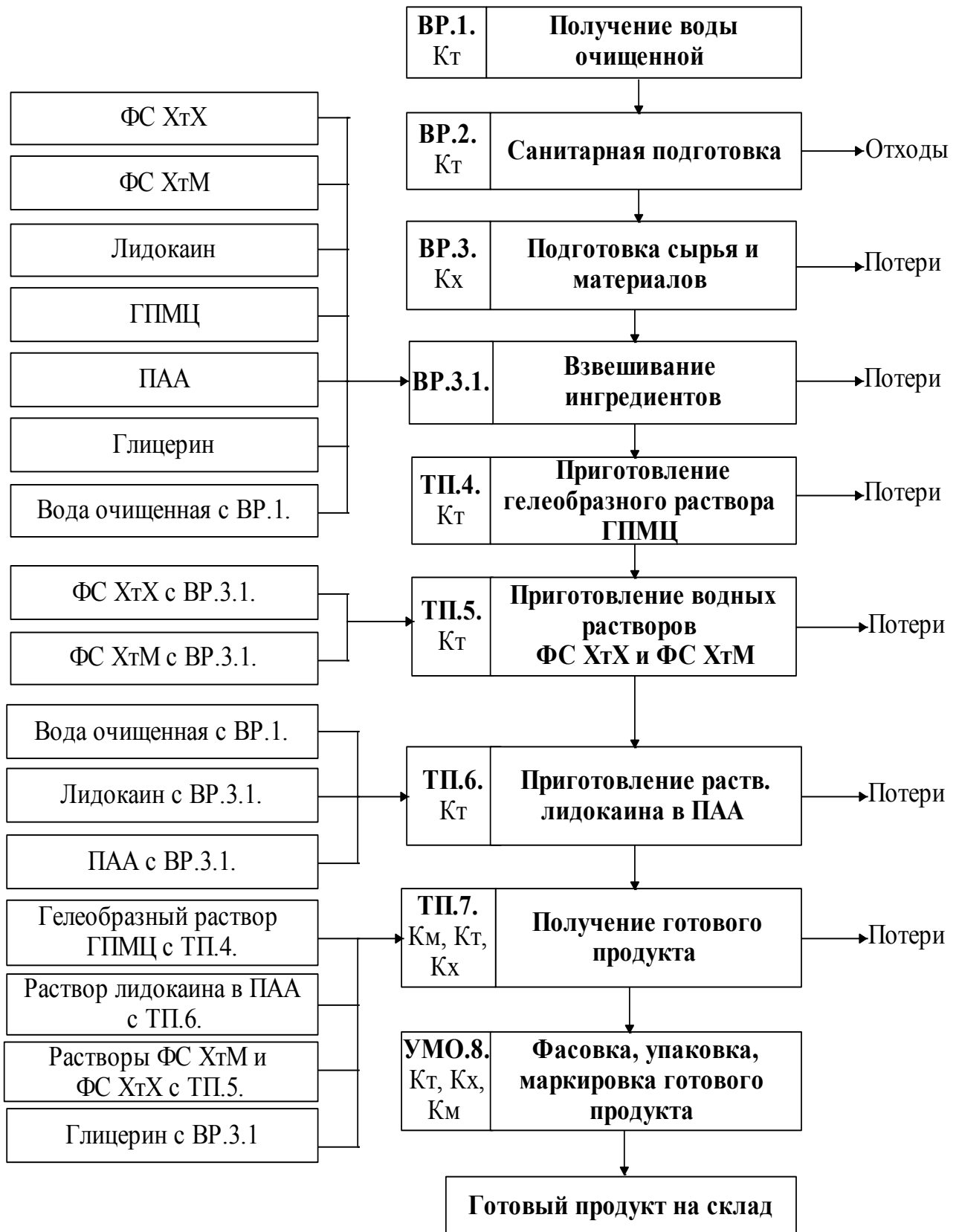
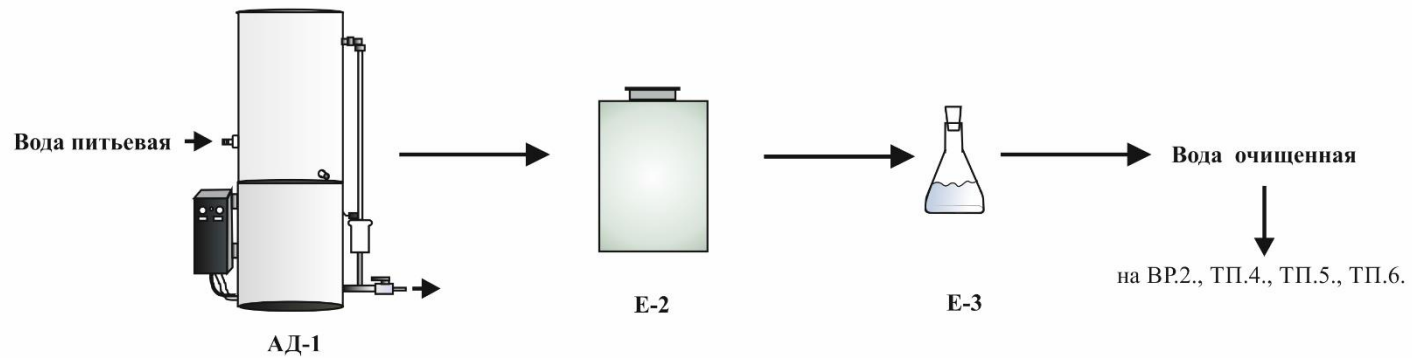


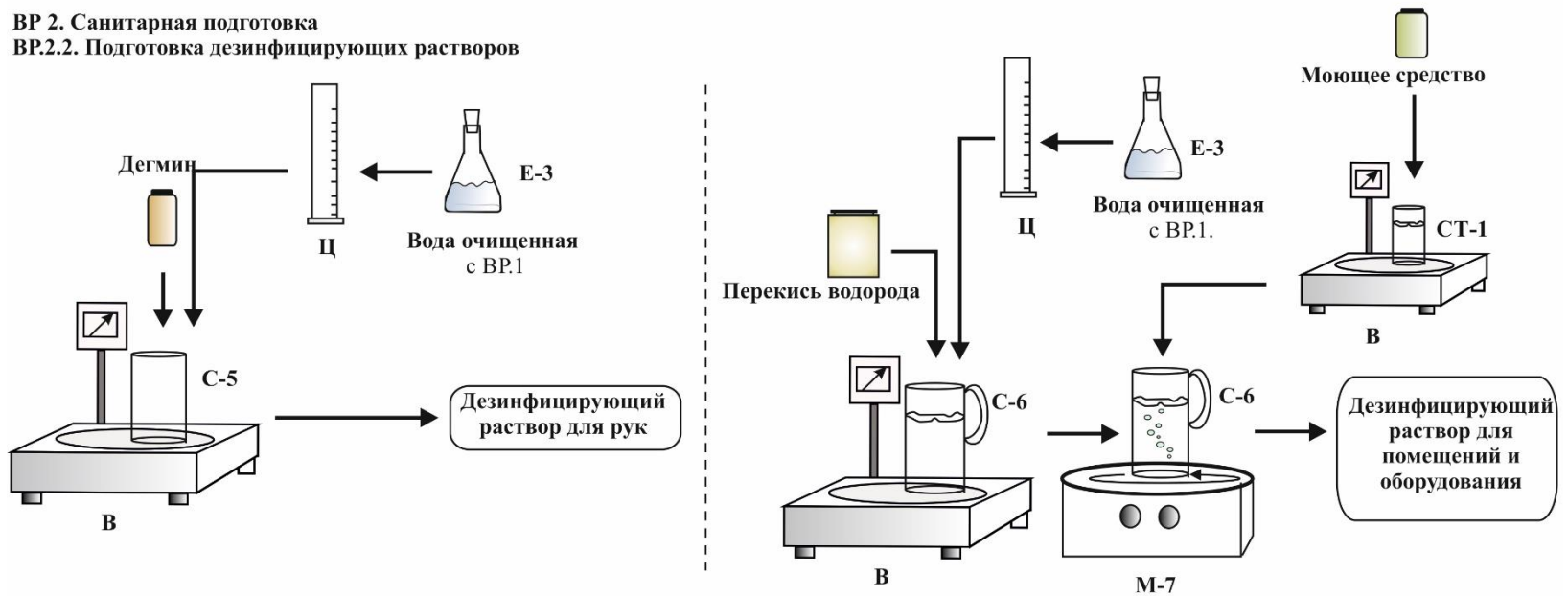
Рисунок 20 – Технологическая схема производства «Гель ранозаживляющий»

АППАРАТУРНАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА

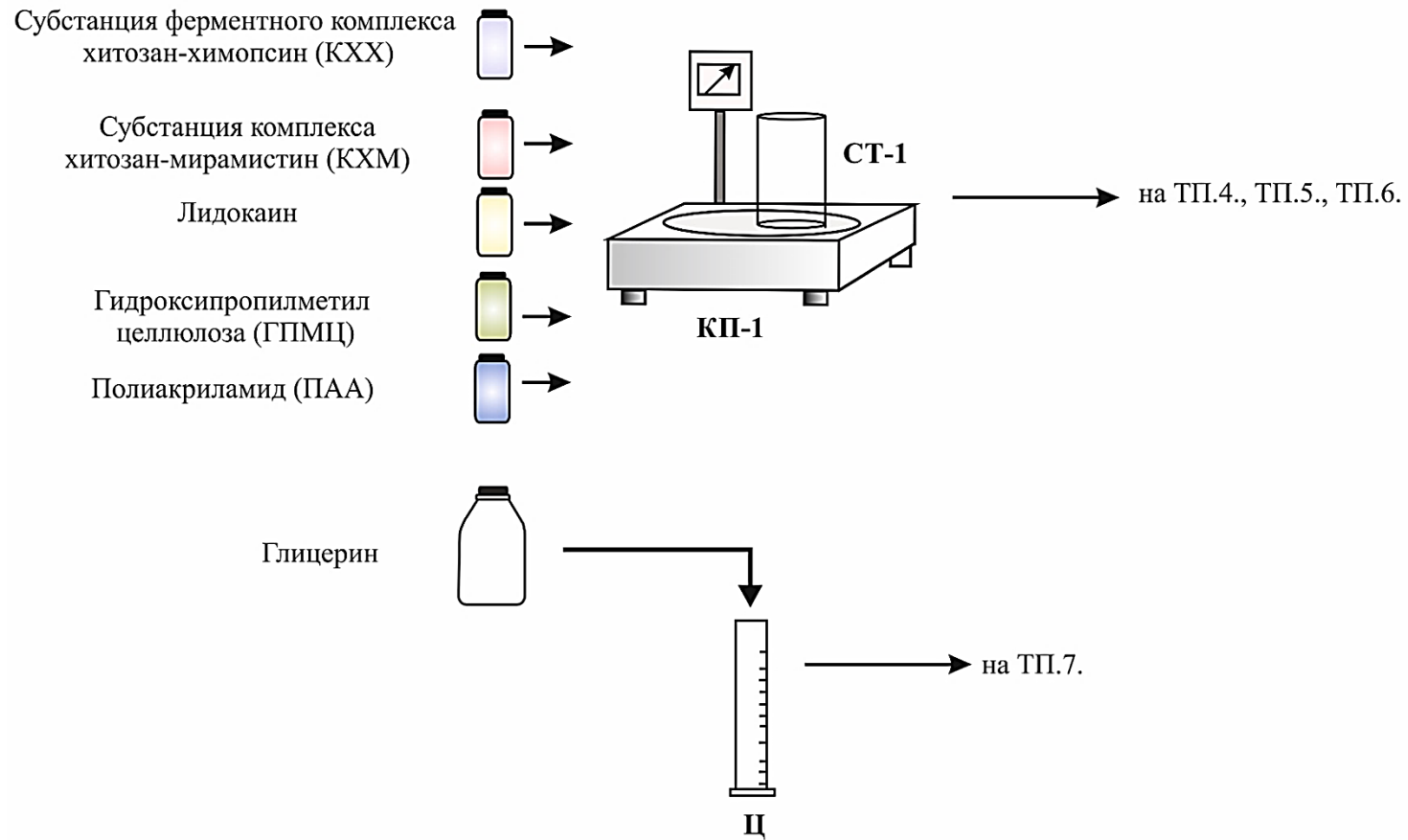
ВР.1. Получение воды очищенной

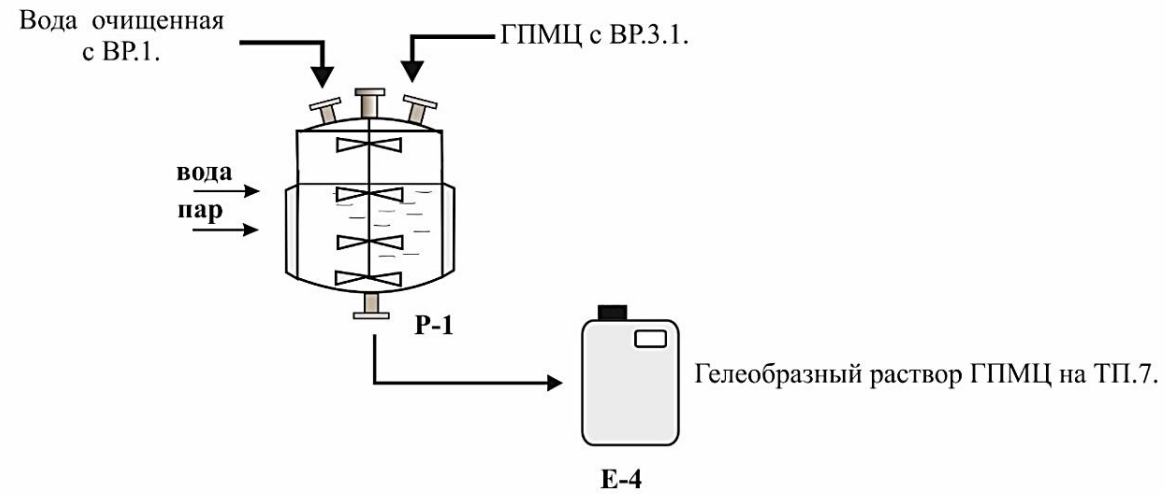
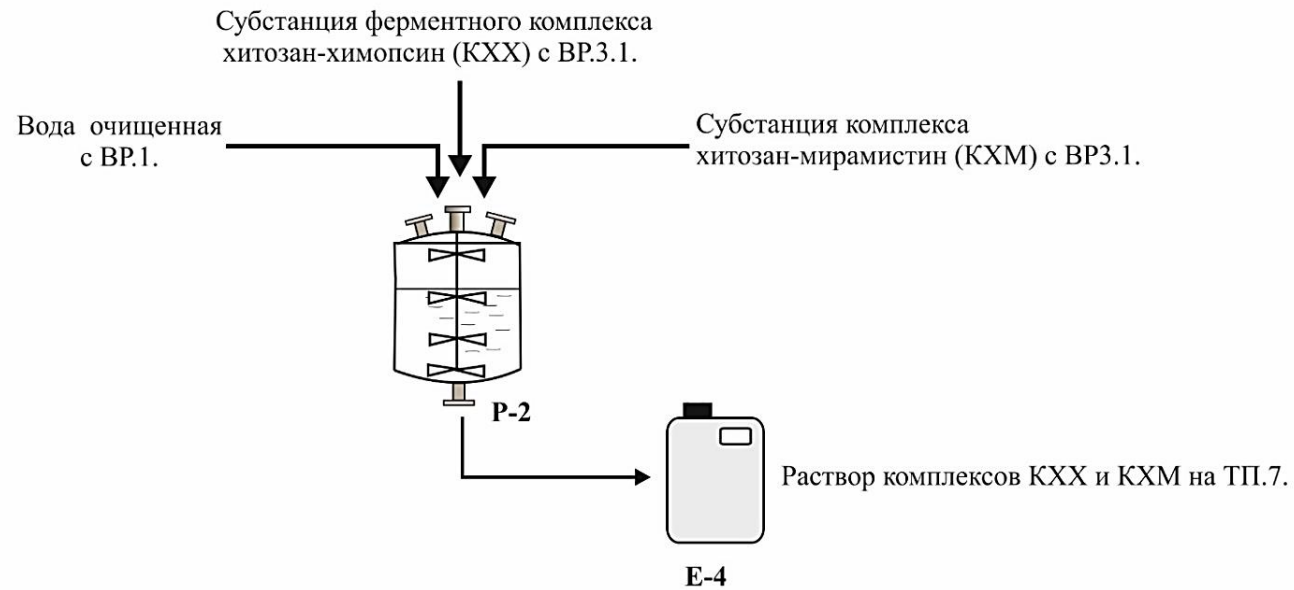


ВР 2. Санитарная подготовка ВР.2.2. Подготовка дезинфицирующих растворов

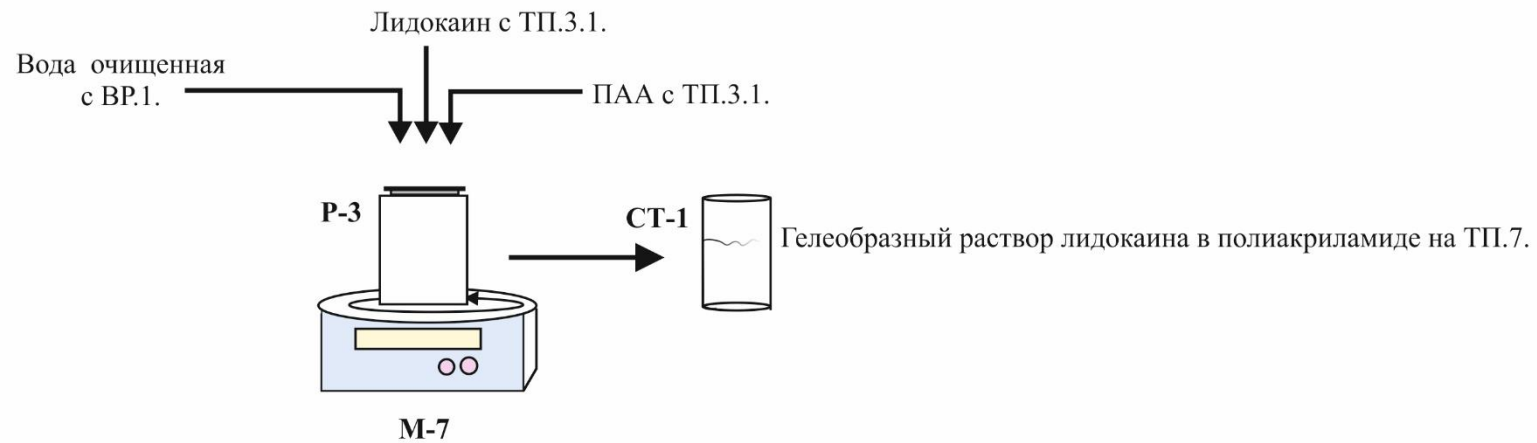


ВР.3. Подготовка сырья и материалов
ВР.3.1. Взвешивание ингредиентов



ТП. 4 Приготовление гелеобразного раствора ГПМЦ**ТП. 5 Приготовление водного раствора комплексов хитозан-химопсин (КХХ) и хитозан-мирамистин (КХМ)**

ТП.6. Приготовление раствора лидокаина в полиакриламиде



ТП.7. Получение Геля ранозаживляющего

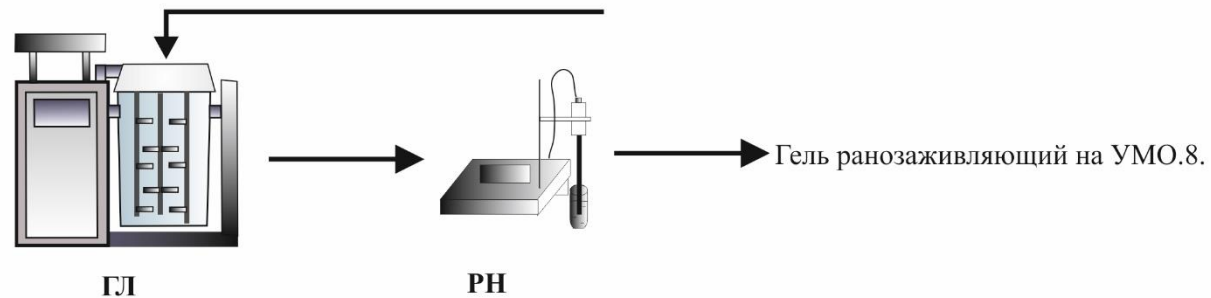
Раствор комплексов КХХ и КХМ с ТП.5.

Глицерин с ВР.3.1.

Гелеобразный раствор
лидокаина в полиакриламиде с ТП.6.

Гелеобразный раствор
лидокаина в полиакриламиде с ТП.6.

р-р ГПМЦ с ВР.3.1.



УМО.8 Фасовка, упаковка, маркировка ГЛФ Геля ранозаживляющего

Стадия УМО.8.

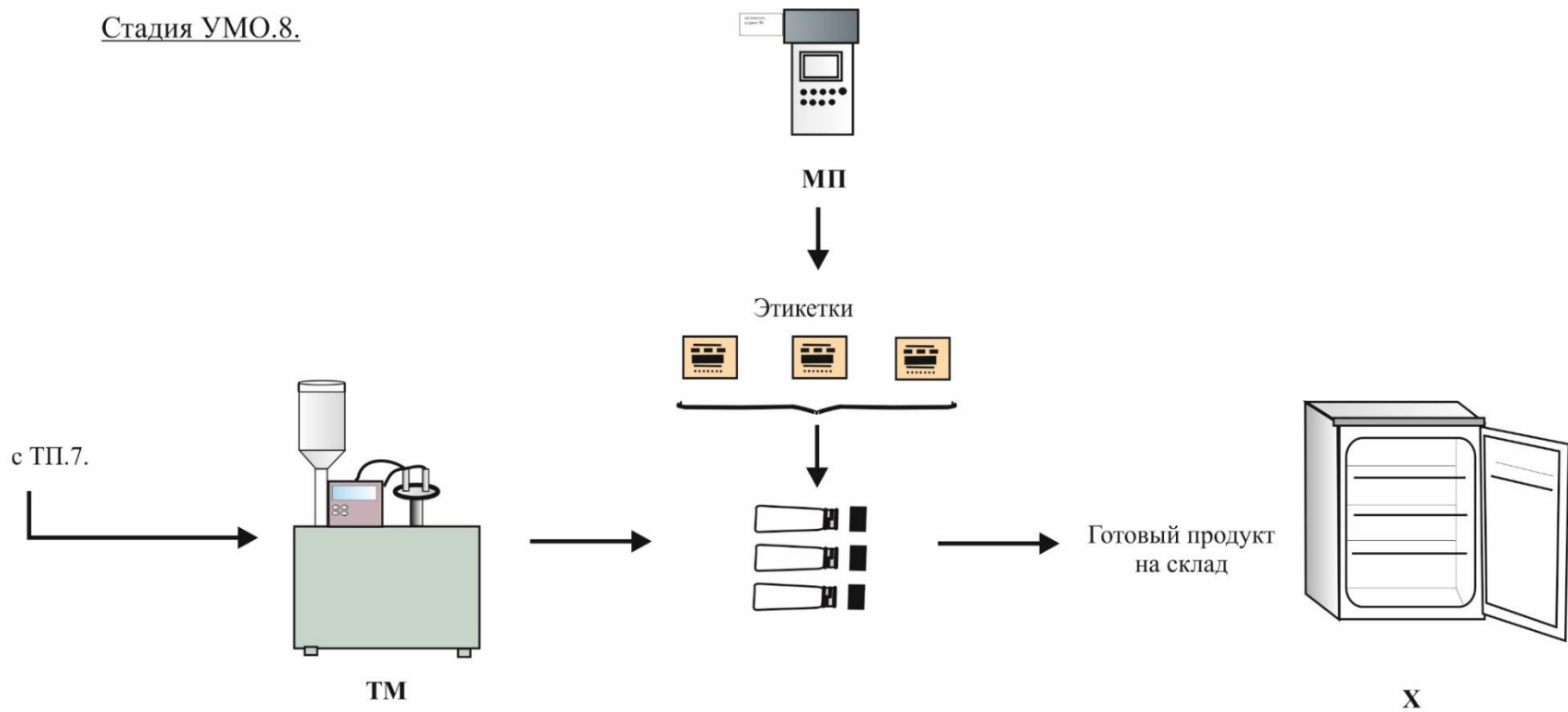


Рисунок 21 – Аппаратурная схема производства

4. Аппаратурная схема производства и спецификация оборудования

Аппаратурная схема производства и спецификация оборудования состоит из чертежа аппаратурной схемы производства и спецификации оборудования. Перечень оборудования и приборов, изображённых на аппаратурной схеме производства (рис. 21) представлен в таблице 11. Ведомость спецификаций основного оборудования, КИПиСА с их техническими характеристиками представлена в таблице 12.

Таблица 11 - Перечень оборудования и приборов, изображённых на аппаратурной схеме производства

Обозначения	Наименование	Кол-во, шт	Примечание
АД-1	Система водоподготовки Аквадистиллятор KSL 8/60, KSL 12/60	1	Система водоподготовки Аквадистиллятор KSL 8/60, KSL 12/60 (Германия)
Е-2	Бутыль для сбора и хранения воды очищенной	3	Вместимость 20 л Бутыль с горловиной под винтовую крышку БТВ-20000 ГОСТ Р 51477-99 Дополнительно снабжена сифоном из стеклянной и силиконовой трубок и зажимом
Е-3	Сосуд для расходования воды очищенной	1	Вместимость 1,0 л Колба коническая (шлиф 29) со стеклянной пробкой ГОСТ 25336-82
Е-4	Канистра	2	Канистра полиэтиленовая с завинчивающейся крышкой, 5 л.
В	Весы лабораторные	1	Точность взвешивания 0,01 г Максимальная нагрузка 600 г
С-5	Ёмкость для приготовления раствора дегмина	1	Пластиковый стакан Вместимость 600 мл NALGENE® (США)
С-6	Ёмкость для раствора перекиси водорода с моющими средствами	1	Пластиковый стакан с ручкой Вместимость 3000 мл NALGENE® (США)
Ц	Цилиндр мерный	3	Вместимость 0,1; 0,5; 1,0 л. Цена деления 1 мл Исполнение 1 (с носиком) ГОСТ 1770-74
М-7	Мешалка магнитная с подогревом	1	Нержав. сталь
КП-1	Технические весы	2	Точность измерения 0,01 г, Предел взвешивания до 6200 кг
СТ-1	Стакан стеклянный	5	Вместимость от 50 мл до 1000 мл
Р-1	Реактор с мешалкой и подогревом	1	Вместимость 10 л
Р-2	Реактор с мешалкой	1	Вместимость 5 л

Б-1	Реактор для приготовления раствора лидокаина в ПАА	1	Банка, стекло Вместимость 2000 мл
ГЛ	Смеситель-гомогенизатор	1	Рабочий объем – 20 л Параметры гомотизатора: Мощность 1,1 Кв., Оборотов в минуту – до 3500 Параметры мешалки: Мощность 0,37 Кв. Оборотов в минуту – до 70 Габаритные размеры 1300x500x1560
РН	рН-метр	1	рН-метр любого типа
ТМ	Тубонаполнительная машина	1	Сталь нержавеющая
МП	Маркировочный принтер	1	AlphaJET mondo, Германия
Х	Холодильник лабораторный «Arctiko»	1	Двухкамерный; пластик, металл

Таблица 12 - Ведомость спецификаций основного оборудования, КИПиСА с их техническими характеристиками

Обозначения	Наименование	Кол-во шт	Материал рабочей зоны	Технологическая характеристика
АД-1	Система водоподготовки Аквадистиллятор KSL 8/60, KSL 12/60	1	Сталь, пластик	Давление рабочее 0,5-2,0 бар Температура 10-250 °С Производительность 60 л/ч (Германия)
Е-2	Бутыль для сбора и хранения воды очищенной	10	Стекло	Вместимость 20 л Бутыль с горловиной под винтовую крышку БТВ-20000 ГОСТ Р 51477-99 Дополнительно снабжена сифоном из стеклянной и силиконовой трубок и зажимом
Е-3	Сосуд для расходования воды очищенной	1	Стекло	Вместимость 1,0 л Колба коническая (шлиф 29) со стеклянной пробкой ГОСТ 25336-82
Е-4	Канистра	2	Полиэтилен	Канистра полиэтиленовая с завинчивающейся крышкой, 5 л.
В	Весы лабораторные	1	Нержав. сталь	Точность 0,01 г Максимальная нагрузка 600 г (Германия)
С-5	Ёмкость для приготовления раствора дегмина	1	Пластик	Пластиковый стакан с ручкой Вместимость 3000 мл NALGENE® (США)
С-6	Ёмкость для раствора перекиси водорода	1	Пластик	Вместимость 600 мл Пластиковый стакан NALGENE® (США)

	моющими средствами			
Ц	Цилиндр мерный	3	Стекло	Вместимость 0,1; 0,5; 1,0 л. Цена деления 1 мл
М-7	Мешалка магнитная с подогревом	1	Нержав. сталь	Скорости вращения 0–2000 об/мин Диапазон температур до 320 °С Диаметр рабочей поверхности 125 мм Габаритные размеры 168 x 220 x 105 Макс объем перемешиваемого материала (вода) -15 л. Модель RH-КТ С (ИКА®, Германия)
КП-1	Технические весы	2	Нержав. сталь	Точность измерения 0,01 г Предел взвешивания до 6200 кг (Sartorius ED6202S-RCE, Германия)
СТ-1	Стакан стеклянный	5	Стекло	Вместимость от 50 до 1000 мл
Р-1	Реактор с мешалкой и подогревом	1	Боросиликатное стекло	Объем реакционной колбы, 10 л Минимальная рабочая температура: -80 °С. Максимальная рабочая температура: +200 °С. Частота вращения мешалки: 50-500 об/мин (частотно-регулируемый привод). Электропитание: 220 В, 50 Гц. Объем теплоносителя в рубашке – 3 л (реактор GR-10L., Greatwall Scientific, Китай)
Р-2	Реактор с мешалкой	1	Боросиликатное стекло	Объем реакционной колбы, 5 л Частота вращения мешалки: 50-500 об/мин (частотно-регулируемый привод). Электропитание: 220 В, 50 Гц. (реактор GR-5L., Greatwall Scientific, Китай)
Б-1	Реактор для приготовления раствора лидокаина в ПАА	1	Стекло	Банка, Вместимость 2000 мл

ГЛ	Смеситель-гомогенизатор	1	Нержав. сталь	Рабочий объем – 20 л Параметры гомогенизатора: Мощность 1,1 Кв., Оборотов в минуту – до 3500 Параметры мешалки: Мощность 0,37 Кв. Оборотов в минуту – до 70 Габаритные размеры 1300x500x1560 (Смеситель-гомогенизатор APZRJ-20B, Китай)
рН	рН-метр	1	Стекло, пластмасса	рН-метр любого типа
ТМ	Тубонаполнительная машина	1	Нержав. сталь	Тип – полуавтоматическая; Кол-во позиций под тубы, Производительность: 20-30 туб/мин Потребляемая мощность - 1,6 КВт Параметры электрической сети - 220 В, 50 КГц Размеры - ~1230*700*1400
МП	Маркировочный принтер	1	Нержав. сталь	Габаритные размеры: Блок управления: 340 x 270 x 550 мм (включая Терминал управления); Печатающая головка: 40 x 40 x 145 мм Макс. потребляемая мощность 0,5 / 0,25 А (Германия)
Х	Холодильник лабораторный	1	Пластик, металл	Двухкамерный. Температура в холодильном отделении: от +2 до +8 °С Температура в морозильной камере: - 10 °С до -45 °С

5. Характеристика сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов

В разделе содержатся данные, регламентирующие требования к качеству сырья, материалов и полупродуктов, применяемых в данном производстве (табл. 13).

Сырьё, используемое для производства геля ранозаживляющего, должно соответствовать утверждённой спецификации и сопровождаться документами, подтверждающими его качество и безопасность. Сроки хранения сырья на момент использования в производстве геля ранозаживляющего не должны превышать сроков годности, указанных производителями.

Таблица 13

Наименование	Обозначение НД	Сорт или артикул	Показатели, обязательные для проверки	Примечания
А. Основное сырье				
Вода питьевая	Сан ПиН 2.1.4.1116-02	питьев ая	<p>Органолептические показатели: Водородный показатель (рН) - 6,5-8,5; Мутность 1,0-0,5 ЕМФ; Показатели солевого состава: Хлориды 250-150 г/л; Сульфаты 250-150 г/л; Фосфаты (PO₄) 3,5 г/л. Микробиологические и показатели: Общие колиформные бактерии - отсутствие в 300 мл. Глюкозоположительные колиформные бактерии - отсутствие в 300 мл. Pseudomonas aeruginosa - отсутствие в 1 000 мл. Критерии безвредности химического состава: Окисляемость перманганатная мг O₂/л: не более 3,0. Общая жесткость, мл-экв/л: не более 7,0. Аммиак и аммоний-ион, мг/л: не более 0,05. Нитраты мг/л: не более 20. Железо мг/л: не более 0,3. Марганец мг/л: не более 0,05.</p>	ВР.1. Получение воды очищенной
ГПМЦ	ID34680 Colorcon Limited, England	Methoc el K4M Premiu m CR	<p>Паспорт поставщика; Проверка сохранности и соответствия упаковки сертификату. Описание – кристаллический порошок белого цвета, без запаха. Вязкость 2% водного раствора – от 2,66 до 4,97. Потеря в массе при высушивании – 2 – 5%. рН 2,0% водного раствора – 5,0-8,0.</p>	ТП.4. Приготовление гелеобразного раствора ГПМЦ Для приготовления основы
Глицерин	ОФС.1.3.000 1.15	ПК-94	<p>Паспорт поставщика. Описание – прозрачная, вязкая жидкость, без запаха, сладковатого вкуса. Плотность при 20 °С – 1,25 г/см³.</p>	ТП.7. Получение ГЛФ

Комплекс хитозан-мирамистин	Проект НД на фармацевтическую субстанцию	-	Проверка сохранности и соответствия упаковки НД. Описание – лиофилизированная масса белого или светло-желтого цвета, со слабым запахом уксусной кислоты. Растворимость - легко растворим в воде. рН водной вытяжки 5,5- 5,6. Потеря в массе при высушивании не > 7,0%. Количество мирамистина не < 35,0 мг/г субстанции.	ТП.5. Приготовление водного раствора комплексов хитозан-химопсин и хитозан-мирамистин ТП.7. Получение ГЛФ
Комплекс хитозан-химопсин	Проект НД на фармацевтическую субстанцию	-	Проверка сохранности и соответствия упаковки НД. Описание – лиофилизированная масса белого или светло-желтого цвета, со слабым запахом уксусной кислоты. Растворимость - очень легко растворим. в воде. рН водной вытяжки 5,1- 5,2. Потеря в массе при высушивании не > 7,0%. Протеолитическая активность не < 2,0 ± 0,5 ПЕ/мг фермента.	ТП.5. Приготовление водного раствора комплексов хитозан-химопсин и хитозан-мирамистин ТП.7. Получение ГЛФ
Лидокаина гидрохлорид	РУНЛСР-008000/10 от 12.08.2010г «Дж. Амфрей лабораториз», Индия	По РУ	Паспорт поставщика; Проверка сохранности и соответствия упаковки РУ. Описание – кристаллический порошок белого или почти белого цвета, без запаха. Содержание основного вещества от 99,0 до 101,0%. рН 0,5% водного раствора от 4,5 до 5,5. Растворимость - очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% этаноле.	ТП.6. Приготовление раствора лидокаина в ПАА ТП.7. Получение ГЛФ
ПАА	ТУ 9398-001-05966919-2008 ООО НТФ «Атомбиотех»	По ТУ	Паспорт поставщика; Проверка сохранности и соответствия упаковки ТУ. Описание – кристаллический порошок белого цвета с желтоватым оттенком, без запаха. Потеря в массе при высушивании не> 7,0%. рН 1,0% водного раствора – 7,0-9,0.	ТП.6. Приготовление раствора лидокаина в ПАА Для приготовления основы

Б. Вспомогательные материалы				
Бумага белая писчая (или этикеточная)	ГОСТ 16510-87 (или ГОСТ 7625-86)	По ГОСТ	Внешний вид, целостность	УМО.8. Фасовка, упаковка, маркировка ГЛФ
Водорода перекись	ГОСТ 177-88	По ГОСТ	Сертификат качества, срок годности.	ВР.2.1. Подготовка дезинфицирующих растворов
Картонные пачки Коробки из картона	ГОСТ 7933-89	-	Внешний вид, целостность	УМО.8. Фасовка, упаковка, маркировка ГЛФ
Полимерная крышка (бушон)	ООО «Фримен» (Россия)	-	Внешний вид (конический ребристый), целостность	УМО.8. Фасовка, упаковка, маркировка ГЛФ
Ткань техническая	ГОСТ 29298-92 Арт. 678/44	-	Внешний вид Наличие сертификата	ВР.2.2. Подготовка помещений Для уборки производственных помещений, лестничных маршей, кабинетов, тамбуров.
Тубы	ООО «Фримен» (Россия)	-	Внешний вид, целостность Тубы, вместимостью 30,0 г - Ламинат: AVL - Диаметр тубы: 25мм - Объем тубы: 30мл - Мембрана: да Декларация о соответствии	УМО.8. Фасовка, упаковка, маркировка ГЛФ

6. Изложение технологического процесса

Технологический процесс излагают последовательно по стадиям с учетом проведения операций, в точном соответствии с технологической и аппаратурной схемами производства, состоит из следующих основных и вспомогательных технологических стадий:

ВР.1. Получение воды очищенной;

ВР 2. Санитарная подготовка;

ВР.2.1. Подготовка производственного воздуха;

ВР.2.2. Подготовка дезинфицирующих растворов;

ВР.2.3. Подготовка помещений;

ВР.2.4. Подготовка оборудования;

ВР.2.5. Подготовка персонала;

ВР.3. Подготовка сырья и материалов;

ВР.3.1. Взвешивание ингредиентов;

ТП.4. Приготовление гелеобразного раствора ГПМЦ;

ТП.5. Приготовление водного раствора комплексов хитозан-химопсин и хитозан-мирамистин;

ТП.6. Приготовление раствора лидокаина в ПАА;

ТП.7. Получение ГЛФ;

УМО.8. Фасовка, упаковка, маркировка ГЛФ.

ВР.1. Получение воды очищенной

В технологическом процессе используется вода очищенная, получаемая с помощью аквадистиллятора (Система водоподготовки KLS 8/60, KLS 12/60, Германия), принцип действия которого основан на конденсации отсепарированного пара. Дистиллят собирают в специальную стеклянную бутылку вместимостью 20 л. Допустимо использовать установку другого типа, которая обеспечивает получение воды очищенной, соответствующей ФС 2.2.0020.15.

ВР.2. Санитарная подготовка

Подготавливают производственный воздух, дезинфицирующие растворы для санитарной обработки помещений, оборудование, персонал, техническую одежду.

ВР 3. Подготовка сырья и материалов

Все поступающие исходное сырье и упаковочные материалы должны быть пройдены входной контроль.

На технических весах КП-1 в стеклянных стаканах СТ-1 взвешивали 162 г лиофилизированного порошка ферментного комплекса хитозан-химопсин, 151 г лиофилизированного порошка комплекса хитозан-мирамистин, 10 г лидокаина, 200 г ГПМЦ, 10 г ПАА, отмеривали мерным цилиндром Ц 500 мл (625 г) глицерина, относительная плотность при 20 °С - 1,25 г/см³ (Кт ВР.3.1.)

ТП.4. Приготовление гелеобразного раствора ГПМЦ

В стеклянный реактор Р-1 вместимостью 10 л наливали 4,5 л (4,5 кг) воды очищенной и нагревали воду до температуры 60-65 °С. (Кт ТП.4. -1.) и, медленно, при перемешивании, добавляли 200 г ГПМЦ. Полученную смесь оставляли на 5-6 часов для набухания и полного исчезновения комков целлюлозы. (Кт ТП.4. -2.) Затем смесь интенсивно перемешивали с помощью пропеллерной мешалки в течение 5-10 минут до получения гомогенной массы.

Получали 4700 г гелеобразного раствора ГПМЦ. Полученный раствор помещали в канистру (5 л) для дальнейшего использования. В результате механических потерь получали 4670 г геля.

ТП.5. Приготовление водного раствора комплексов хитозан-химопсин и хитозан-мирамистин

В реактор Р-2 заливали 3,84 л (3,84 кг) воды очищенной и добавляли 162 г лиофилизированного порошка комплекса хитозан-химопсин. Реакционную массу перемешивали 5-10 минут в реакторе до полного растворения субстанции хитозан-химопсин (Кт ТП.5. -1) и добавляли 151 г лиофилизированного порошка комплекса хитозан-мирамистин. Образовавшуюся массу далее перемешивали еще в течение 1,0 часа до полного растворения субстанции хитозан-мирамистин. (Кт ТП.5. -2.)

Получали 4153 г раствора желтоватого цвета комплексов хитозан-химопсин и хитозан-мирамистин. Процесс проводили при комнатной температуре 15 до 25 °С. При переливе в канистру на 5 л для дальнейшего использования на ТП.7. получали 4120 г за счет механических потерь.

ТП.6. Приготовление раствора лидокаина в полиакриламиде

В банку стеклянную на 2 л Б-1 заливали 0,5 л (0,5 кг) воды очищенной, нагревали на М-7 до температуры 60-65 °С (Кт ТП.6. -1) и постепенно, при перемешивании, добавляли 10 г ПАА. Смесь оставляли стоять при комнатной температуре 1 час для набухания и структурирования полимерной массы (Кт ТП.6. -2), после чего ее хорошо перемешивали и добавляли 10 г лидокаина. Полученную реакцию массу выдерживали при комнатной температуре 30 мин., периодически перемешивая, до полного растворения лидокаина. (Кт ТП.6. -3).

Получали 520 г гелеобразного раствора лидокаина в ПАА. Процесс проводили при комнатной температуре 15 до 25 °С. При переливе на дальнейшую стадию получали за счет механических потерь 500 г раствора.

ТП.7. Получение ГЛФ

Лекарственную форму в виде геля для наружного применения получали с помощью смесителя-гомогенизатора.

Гомогенизатор был оборудован системой вертикального подъёма из реактора крышки с мешалкой. Специальная якорная мешалка была снабжена направляющими смесительными лопастями для обеспечения интенсивного перемешивания массы в горизонтальной и вертикальной плоскостях, что позволяло избежать появления застойных зон в области смешивания. Привод мешалки с редуктором большой мощности совместно с плавной регулировкой скорости вращения, регулируемой с помощью сенсорной ЖК панели управления мешалки, давал возможность перемешивать составы в широком диапазоне, от жидкостей до

высоковязких составов. Для обеспечения оптимального теплообмена перемешиваемых продуктов мешалка смесителя была снабжена скребками для снятия продукта с внутренних стенок смесителя.

Процесс гомогенизации проводили в чаше смесителя-гомогенизатора, для чего в него помещали ранее приготовленный раствор ГПМЦ с ТП.4. в количестве 4670 г, гелеобразный раствор лидокаина в ПАА с ТП.6. в количестве 500 г, раствор комплексов хитозан-химопсин и хитозан-мирамистин в количестве 4120 г с ТП.5. и 500 мл (625г) раствора глицерина. Полученную гелеобразную массу подвергали гомогенизации в течение 10-15 минут при скорости вращения мешалки 2000 - 3000 об/мин. (Кт ТП.7. -1)

В результате получали реакционную массу в виде густой белой пены, которую выдерживали при комнатной температуре в течение 24 часов для удаления пузырьков воздуха (дегазации), после чего получали однородную гелеобразную массу со слабым молочно-белым или желтоватым оттенком, без запаха, в количестве 9990,0 г. (Кт ТП.7. -2)

Проводили контроль качества нерасфасованного геля ранозаживляющего.

pH 1,0% водного раствора геля - 5,1 до 5,3; вязкость - 0,50 – 1,0 Па·с. (Кх, ТП.7. -3)

УМО.8. Фасовка, упаковка, маркировка ГЛФ

Гель для наружного применения упаковывали в тубы. Тубы, вместимостью 30,0 г, с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой наполняли с помощью тубонаполнительной машины ТМ. На тубу наклеивали этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или бумаги писчей по ГОСТ 18510-87.

На этикетках указывали: наименование ЛП, номер серии, срок годности, количество в граммах. (Кт УМО.8. -1).

Каждую тубу вместе с инструкцией по применению помещали в картонную пачку. На картонной пачке хорошо читаемым шрифтом на русском языке должны быть указаны наименование ЛП, наименование производителя, номер серии, номер регистрационного удостоверения, срок годности, способ применения, количество, лекарственная форма, условия отпуска, условия хранения, предупредительные надписи.

Тубы с гелем упаковывали в картонные коробки согласно ГОСТ 17768-90 (Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение).

Готовый продукт отгружали на склад, пробы передавали на анализ по НД (Кх, Км УМО.8. -2).

7. Материальный баланс

Материальный баланс был составлен на 9690,0 кг Геля ранозаживляющего (табл. 14).

Таблица 14 – Материальный баланс производства ГЛФ Геля ранозаживляющего

Наименование основного сырья и полупродуктов	Заданная масса единицы лекарственной формы, г	Рассчитанный объем серии (количество единиц лекарственной формы, штук)	Рассчитанная масса сырья, кг	Получено	
				Кол-во ед. лек. формы, штук	Масса, кг
ГЛФ «Гель ранозаживляющий»				323	9,69
	30	333			
Комплекс хитозан- химопсин			0,162		
Комплекс хитозан- мирамистин			0,151		
Лидокаина гидрохлорид			0,01		
ГПМЦ			0,2		
ПАА			0,01		
Глицерин			0,625		
Вода очищенная			8,840		
Отходы					-
Потери:					
пробы на анализ и архивное хранение				10	0,3
механические					0,008
ИТОГО	30	333	9,998	333	9,998

8. Переработка и обезвреживание отходов производства

В этом разделе описаны процессы переработки отходов, обезвреживания отходов. Отходы, перерабатываемые на отдельных стадиях, обезвреживаемые отходы, обезвреживаемые технологические и вентиляционные выбросы, очищаемые технологические и вентиляционные выбросы и отходы, которые передаются для переработки или обезвреживания в производстве геля ранозаживляющего, отсутствуют.

9. Контроль производства

В этом разделе представлен перечень важнейших контрольных точек производства, обеспечивающих соблюдение установленного технологического режима (табл. 15).

Таблица 15 - Перечень важнейших контрольных точек производства

Наименование стадий, места измерения параметров или отбора проб	Наименование объекта контроля	Наименование контролируемого параметра, единицы измерений	Регламентированный норматив (значение параметра)	Методы и средства контроля	Кто производит контроль, и в каком документе регистрируют результаты
1	2	3	4	5	6
ВР.1. Получение воды очищенной (Кх ВР.1.1)	Вода очищенная	Контроль по физико-химическим показателям в соответствии с требованиями ФС.2.2.0020.18	В соответствии с требованиями ФС.2.2.0020.18	В соответствии с требованиями ФС.2.2.0020.18	Лаборант - в операционном листе
ВР.2.1. Подготовка производственного воздуха (Кт ВР.2.1.-1, Кт ВР.2.1.-2)	Производственный воздух	Температура	СОП по подготовке производственного воздуха	Показание термометра	Лаборант - в журнале контроля воздуха
		Влажность		Показание гигрометра	
ВР.2.2. Подготовка дезинфицирующих растворов (Кт ВР.2.2.-1, Кт ВР.2.2.-2)	Дезинфицирующие растворы	Концентрация	СОП по приготовлению и использованию дезинфицирующих и моющих средств	В соответствии с СОП.	Лаборант - в протоколе анализа
		Срок хранения рабочих растворов			

ВР.2.3. Подготовка помещений (Кт ВР.2.3-1)	Производственные помещения	Чистота рабочих поверхностей	СОП по санитарной подготовке помещений и оборудования	В соответствии с СОП.	Лаборант - в рабочем журнале
ВР.2.4. Подготовка оборудования (Кт ВР.2.4.)	Технологическое оборудование, инвентарь	Чистота и исправность оборудования и аппаратуры	СОП по санитарной подготовке помещений и оборудования	В соответствии с СОП.	Лаборант - в маршрутной карте
ВР.3. Подготовка сырья и материалов (Кх ВР.3.-1) (Кх ВР.3.-2)	Сырье и материалы	Качество упаковки (входной контроль)	СОП по отбору проб исходного сырья, материалов и готовой продукции	Визуальный	Лаборант - в рабочем журнале
		Маркировка		Визуальный	
		Отбор пробы для анализа (входной контроль)		Химический анализ пробы	Аналитик – в протоколе анализа
ВР.3.1. Взвешивание ингредиентов (Кт ВР.3.1.)	Отвесы сырья	Количество Количество Количество лидокаина Количество ГПМЦ Количество ПАА Количество глицерина	162,0 г 151,0 г 10,0 г 200,0 г 10,0 г 500,0 мл	Весовой	Лаборант - в рабочем журнале

ТП.4. Приготовление гелеобразного раствора ГПМЦ (Кт ТП.4.-1., Кт ТП.4.-2.)	Температура нагрева воды очищенной Сырье, ГПМЦ	Измерение температуры	60-65°C	Показания термометра	Лаборант - в рабочем журнале
		Набухание и полное исчезновение комков ГПМЦ	5-6 часов	Визуальный	
ТП.5. Приготовление водного раствора комплексов хитозан-химопсин и хитозан-мирамистин (Кт ТП.5.-1., Кт ТП.5.-2.)	Сырье	Контроль растворения	5-10 мин	Визуальный	Лаборант - в рабочем журнале
	Сырье	Контроль растворения	1 час	Визуальный	
ТП.6. Приготовление раствора лидокаина в полиакриламиде (Кт ТП.6.-1., Кт ТП.6.-2., Кт ТП.6.-3.)	Температура нагрева воды очищенной	Измерение температуры	60-65 °C	Показания термометра	Лаборант –в рабочем журнале
	Сырье, ПАА	Набухание	1 час	Визуальный	
	Сырье, лидокаин	Растворение лидокаина	30 мин	Визуальный	
ТП.7. Получение Геля ранозаживляющего (Кт ТП.7.-1 Кт ТП.7.-2, Кх ТП.7.-3)	Смешение ингредиентов, контроль качества не расфасованного геля ранозаживляющего	Контроль перемешивания	10-15 минут	Визуальный	Лаборант –в рабочем журнале
		Выдерживание для дегазации	24 часа	Визуальный	
		Внешний вид	Однородная гелеобразная масса со слабым молочно-белым или желтоватым оттенком, без запаха	Визуальный	

		рН	5,1-5,3	Показание рН-метра	
		Вязкость	0,7 - 1,2 Па·с	Показание вискозиметра	
УМО.8. Фасовка, упаковка, маркировка ГЛФ Геля ранозаживляющего (Кт УМО.8.-1., Кх,м УМО.8.-2)	Первичная На первичной упаковке	Внешний вид Содержание этикетки	Отсутствие загрязнений, повреждений В соответствии с НД	Визуальный. Постоянно в процессе маркировки	Лаборант- в рабочем журнале
	ГЛФ Геля ранозаживляющего	Описание	Однородная гелеобразная масса со слабым молочно-белым или желтоватым оттенком, без запаха	Визуальный Органолептический ГФ РФ	Аналитик --в рабочем журнале, аналитическом листе
		Подлинность	Гель должен обладать протеолитической активностью	А. Протеолитическая активность, спектрофотометрическ ий метод Б. Качественная реакция на химопсин	
		Химопсин	Гель должен обладать способностью створаживать молоко за время не более 50 сек.		
		Мирамистин	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО мирамистина		А. ВЭЖХ
		Лидокаин	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени	А. ВЭЖХ Б. Качественная реакция с кобальта хлоридом	

			удерживания основного пика на хроматограмме СО лидокаина Появление ярко-зеленого окрашивания.		
		Масса (объем) содержимого упаковки	Среднее значение массы содержимого упаковки не должно быть менее 95,0% от указанной массы	ГФ РФ	
		pH	от 5,1 до 5,3 (1,0% водный раствор)	ГФ РФ Потенциометрический	
		Вязкость	от 0,70 до 1,2 Па·с	ГФ РФ	
		Микробиологическая чистота	Категория 2	ГФ РФ	
		Количественное определение:			
		Химопсин	Не менее 2,0±0,5 ПЕ на 1 мг химопсина	Протеолитическая активность - Спектрофотометрический	
		Мирамистин	от 95 до 105% от заявленного количества	ВЭЖХ	
		Лидокаин	от 95 до 105% от заявленного количества	ВЭЖХ	

10. Безопасная эксплуатация производства

В разделе приводятся технологические данные, необходимые для разработки и осуществления мер по обеспечению безопасности и оптимальных санитарно-гигиенических условий труда работающих, в том числе:

- характеристика опасностей производства;
- возможные неполадки и аварийные ситуации, способы их предупреждения и устранения;
- защита технологических процессов и оборудования от аварий и защита работающих от травмирования;
- меры безопасности, которые следует соблюдать, при эксплуатации производственных объектов.

Информация в разделе представлена в форме таблиц:

- основные сведения по характеристике пожаровзрывоопасных свойств сырья, полупродуктов, готовой продукции и отходов производства;
- сведения о токсических свойствах и санитарно-гигиенических характеристиках сырья, полупродуктов, готовой продукции, вспомогательных веществ и отходов производства;
- сведения о взрывопожарной и пожарной опасности производственных зданий, помещений;
- санитарная характеристика производственных процессов;
- возможные неполадки и аварийные ситуации, способы их предупреждения и устранения;
- защита технологических процессов и оборудования от аварий;
- возможность электризации с образованием опасных потенциалов, способы защиты;
- средства индивидуальной защиты работающих.

11. Охрана окружающей среды

В разделе приводится перечень всех выбросов в окружающую среду: пыле-газообразных, жидких, твердых.

При получении ГЛФ Геля ранозаживляющего вредных выбросов в атмосферу нет.

12. Перечень производственных инструкций

В ОПР на получение ГЛФ приведен перечень инструкций, наличие которых и руководство которыми обязательно для ведения данного технологического процесса.

13. Техничко-экономические нормативы

В разделе приведены нормативы, характеризующие технический уровень и эффективность производства, гарантируемые регламентом:

- 1) коэффициенты полезного использования сырья и материалов (оптимальные выходы целевых продуктов);
- 2) ежегодные нормы расхода основных видов сырья и материалов;
- 3) ежегодные нормы расхода технологических энергозатрат (пара, воды, электроэнергии, сжатого воздуха, инертного газа и др.);
- 4) технические показатели, определяющие мощность производства и эффективность использования основных фондов;
- 5) трудозатраты на единицу конечного продукта.

14. Информационные материалы

Настоящий раздел содержит справочный материал, характеризующий обоснованность показателей ОПР, и информационные данные.

Фармацевтическая субстанция комплекс хитозан-химопсин - лиофилизированная масса белого или светло-желтого цвета, со слабым запахом уксусной кислоты, очень легко растворима в воде; рН водной вытяжки 5,1- 5,2; потеря в массе при высушивании не более 7,0%; протеолитическая активность не менее $(2,0 \pm 0,5)$ ПЕ/мг фермента;

Фармацевтическая субстанция хитозан-мирамистин - лиофилизированная масса белого или светло-желтого цвета, со слабым запахом уксусной кислоты, легко растворима в воде, рН водной вытяжки 5,5-5,6, потеря в массе при высушивании не более 7,0%, количество мирамистина не менее 35,0 мг/г субстанции;

Лидокаина гидрохлорид - кристаллический порошок белого или почти белого цвета, без запаха, содержание основного вещества от 99,0 до 101,0%; рН 0,5 % водного раствора от 4,5 до 5,5, очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% этаноле; РУ №ЛСР-008000/10 от 12.08.2010г. «Дж. Амфрей лабораториз», Индия;

ГПМЦ - Methocel K4M Premium CR, кристаллический порошок белого цвета, без запаха, вязкость 2% водного раствора – от 2,66 до 4,97, потеря в массе при высушивании – 2-5%, рН 2,0% водного раствора – 5.0-8.0, ID34680 Colorcon Limited, England;

ПАА – «Эхотемпогель», кристаллический порошок белого цвета с желтоватым оттенком, без запаха, потеря в массе при высушивании не более 7,0%, рН 1,0% водного раствора – 7,0-9,0. ТУ 9398-001-05966919-2008 ООО НТФ «Атомбиотех»;

Глицерин дистиллированный - прозрачная, вязкая жидкость, без запаха, сладковатого вкуса, плотность при 20 °С – 1,244 г/см³. ПК-94; ОФС.1.3.0001.15.

Вода очищенная - бесцветная прозрачная жидкость без запаха и вкуса, рН от 5,0 до 7,0.

Вода очищенная не должна содержать нитраты, нитриты, восстанавливающие вещества, хлориды, сульфаты, кальций, тяжелые металлы. В воде очищенной нормируется содержание микроорганизмов – не более 100 в 1 мл при отсутствии бактерий семейства Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ФС.2.2.0020.18.

Все остальные реактивы, отечественного производства, квалификации не ниже «ХЧ».

4.2 Разработка аналитических методик определения показателей качества ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

Выбор методик анализа и возможность их применения к разработанной ГЛФ основывался на возможности данных методик оценить подлинность ЛП по действующим веществам и провести количественное определение. Хт является носителем по отношению к химопсину и мирамистину, в структуру ПАА включен анестетик лидокаин, а ГПМЦ выполняет роль гелеобразователя и модификатора вязкости в составе ГЛФ «Гель ранозаживляющий». Действующие вещества – химопсин, лидокаин и мирамистин.

4.2.1 Методика определения протеолитической активности ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

Была разработана методика определения протеолитической активности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» действующим веществом которого является ферментный препарат химопсин. Хт является носителем действующего вещества. Метод основан на гидролизе исследуемым ферментным препаратом казеина по Гамерстену до пептидов и аминокислот с последующим их определением. За единицу протеолитической активности (ПЕ) принимают количество фермента, которое за 1 мин при температуре 37 °С катализирует переход в неосаждаемое состояние 10% раствором трихлоруксусной кислоты такого количества казеина, которое соответствует 1 мкМоль тирозина.

Основное оборудование: UV-Vis-спектрофотометр Shimadzu UV-2600 с термостатируемой кинетической ячейкой (ТСС-240А) и ИК-Фурье спектрометр Nicolet 380 с приставкой НПВО (Thermo Scientific, США).

Приготовление 0,1 М фосфатного буферного раствора: 9,078 г (KH_2PO_4) калия фосфорнокислого однозамещенного (точная навеска) растворяли в воде в мерной колбе вместимостью 1000 мл и доводили объем раствора до метки. 23,881г ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) натрия фосфорнокислого двузамещенного растворяли в воде в мерной колбе вместимостью 1000 мл и доводили объем буфера до метки. Смешиванием различных объемов растворов гидрофосфата

натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) и дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) получали растворы с различным значением pH. Результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16

Na_2HPO_4 (в мл)	KH_2PO_4 (в мл)	pH	Na_2HPO_4 (в мл)	KH_2PO_4 (в мл)	pH
0,00	10,00	4,49	6,00	4,00	6,98
0,10	9,90	4,94	7,00	3,00	7,17
0,25	9,75	5,29	8,00	2,00	7,38
0,50	9,50	5,59	9,00	1,00	7,73
1,00	9,00	5,91	9,50	0,50	8,04
2,00	8,00	6,24	9,75	0,25	8,34
3,00	7,00	6,47	9,90	0,10	8,67
4,00	6,00	6,64	10,00	0,00	9,18
5,00	5,00	6,81			

Пример: Для получения раствора с pH 8,0 брали 936 мл раствора гидрофосфата натрия (точная навеска) и помещали в мерную колбу объемом 1000 мл и доводили объем буфера до метки раствором дигидрофосфата калия. Измеряли pH. В случае отклонения от pH 8,0 доводили до требуемого значения одним из буферных растворов. Срок годности исходных растворов и буфера – 2 месяца при хранении в холодильнике.

Приготовление 2% раствора казеина по Гамерстену: 2,0 г (точная навеска) казеина по Гамерстену (ТУ 6-09-3574-74) растворяли в 100 мл фосфатного буфера с pH 8,0 при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После растворения измеряли pH раствора и при необходимости доводили его до pH 8,0 5М раствором натрия гидроксида. Раствор использовали свежеприготовленным.

Приготовление 10% раствора кислоты трихлоруксусной: в мерную колбу вместимостью 1000 мл наливали 200–250 мл воды и вносили 100,0 г (точная навеска) кислоты трихлоруксусной (ТУ 6-09-1926–77). Раствор доводили водой до метки и перемешивали. Раствор был годен в течение 6 месяцев при хранении в темной бутылки и при температуре не выше 20 °С.

Приготовление раствора А: 36,2 мг (точная навеска) тирозина помещали в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяли в 100-150 мл раствора Б и доводили объем до метки тем же растворителем. 1 мл полученного раствора содержит 0,40 мкМоль тирозина. Раствор был годен 1 месяц при хранении в холодильнике.

Приготовление раствора Б: в мерную колбу вместимостью 500 мл приливали 50 мл фосфатного буферного раствора pH 8,0 и доводили до метки 10% раствором трихлоруксусной кислоты. Раствор использовали свежеприготовленным.

Построение калибровочного графика: в пробирки с притертыми пробками приливают растворы А и Б в соответствии с таблицей 17.

Таблица 17 – Разбавление растворов

№ образцов	Объем раствора А, мл	Объем раствора В, мл	Содержание тирозина, С, мкМоль/мл
1	1,0	9,0	0,04
2	2,0	8,0	0,08
3	3,0	7,0	0,12
4	4,0	6,0	0,16
5	5,0	5,0	0,20
6	6,0	4,0	0,24
7	7,0	3,0	0,28
8	8,0	2,0	0,32
9	9,0	1,0	0,36
10	Раствор А	-	0,40

Растворы перемешивали, выдерживали при комнатной температуре 10-15 мин и измеряли оптическую плотность (D) на спектрофотометре при длине волны 280 ± 2 нм в кювете толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор Б. Калибровочный график строили, откладывая на оси абсцисс концентрацию тирозина (C), а на оси ординат соответствующую оптическую плотность (D).

Испытуемый раствор: Навеску образца 2,0 г (точная навеска) помещали в мерную колбу объемом 20мл, добавляли 10 мл воды дистиллированной, смесь перемешивали до полного растворения субстанции и доводили объем раствора до метки дистиллированной водой. На анализ брали 0,2 мл испытуемого раствора.

Раствор субстрата: в качестве субстрата использовали 2% раствор казеина по Гаммерстену (MP Biochemicals, 0210128901) в 0,1М растворе фосфатного буфера, pH 8,0. Перед анализом pH раствора казеина доводили до pH 8,0 раствором 30% натрия гидроксида. Раствор субстрата хранили в темном месте при температуре 5-7 °С не более 10 дней.

Порядок проведения анализа: За единицу ПЕ принимают количество фермента, которое за 1 мин при температуре 37 °С катализирует переход в неосаждаемое состояние 10% раствором трихлоруксусной кислоты такого количества казеина, которое соответствует 1 мкМоль тирозина. Для определения брали три аналитические пробы испытуемого раствора объемом 0,2 мл – две опытные и одну – контрольную.

В три пробирки с притертыми пробками вместимостью 10,0 мл приливали 1,8 мл 0,1М фосфатного буферного раствора с pH 8,0 и 2,0 мл 2% раствора казеина по Гамерстену в каждую. Пробирки закрывали пробками и помещали в водяной термостат при температуре $37 \pm 0,5$ °С.

Через 10 мин в опытные пробирки быстро приливали испытуемый раствор. Реакцию останавливали через 25-30 минут добавлением в опытные пробирки по 4,0 мл 10% раствора кислоты трихлоруксусной. Через 15 мин раствор центрифугировали при 20 °С в течение 20 минут при 14000 оборотах/мин, в фильтрате спектрофотометрически определяли оптическую плотность при длине волны 280 ± 2 нм в кювете толщиной 10 мм. В контрольную пробирку сначала добавляли 4 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты, а затем испытуемый раствор. Спектрофотометр настраивали по раствору, состоящему из равных объемов 0,1М фосфатного буферного раствора и 10% раствора трихлоруксусной кислоты.

Требуемое значение показателя качества. Протеолитическая активность ГЛФ «Гель ранозаживляющий» должна быть не меньше $2,0 \pm 0,5$ ПЕ/г геля.

4.2.2 Методика определения подлинности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» по химопсину

Была разработана методика определения подлинности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» по химопсину. Метод основан на способности ферментного препарата химопсина створаживать растворы молока. Створаживающая активность выражается временем, прошедшим с момента добавления испытуемого раствора до появления первых признаков створаживания молока.

Основное оборудование: Термостат с прозрачными стенками ТПС.

Приготовление раствора молока: Натуральное свежее коровье молоко центрифугировали 30 мин, удаляли жир и лиофильно высушивали. Хранили в стеклянной банке с притертой крышкой в темном, прохладном месте.

Сухое молоко пригодно к употреблению в течение 6 месяцев. 0,75 г сухого обезжиренного молока растирали в ступке с небольшим количеством воды. Растертую массу количественно переносили в цилиндр вместимостью 50,0 мл, добавляли 1,0 мл 3 М раствора кальция хлорида и 5,0 мл 1М ацетатного буфера рН 5,6, доводили водой до 50,0 мл и перемешивали. Раствор молока готовили непосредственно перед проведением анализа.

Приготовление 1М ацетатного буфера рН 5,6: 5,8 мл уксусной кислоты ледяной помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. 13,6 г натрия ацетата безводного помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, растворяли в воде, объем раствора доводили водой до метки и перемешивали.

Смешивали полученные растворы в объемном соотношении 5,5:44,5. рН буферной смеси 5,6

Порядок проведения анализа: Около 2,0 г (точная навеска) геля растворяли в 4,0 мл 0,1М ацетатного буферного раствора рН 5,6. В 3 пробирки вместимостью 20,0 мл вносили по 12,0 мл раствора молока и прогревали их в течение 30 мин при $35,5 \pm 0,5$ °С. Затем в 2 пробирки,

последовательно, добавляли по 2,0 мл испытуемого раствора, взбалтывали и отмечали время по секундомеру.

Наблюдение проводили в проходящем свете, не вынимая пробирок из термостата. Конец реакции отмечали по появлению первых признаков створаживания. В контрольную пробу (3-я пробирка) к раствору молока добавляли 2,0 мл 0,1М ацетатного буферного раствора pH 5,6 и выдерживали в термостате 60 мин по секундомеру.

Молоко не должно свертываться.

Требуемое значение показателя качества. Время створаживания для ГЛФ «Гель ранозаживляющий» должно быть не более 50 сек.

4.2.3 Методика количественного определения мирамистина методом ВЭЖХ

Была разработана методика качественного и количественного определения мирамистина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий» методом ВЭЖХ.

Мирамистин является действующим веществом разрабатываемого ЛП. ВЭЖХ позволяет совмещать в одной пробе несколько испытаний, в том числе «Подлинность» и «Количественное определение».

Для разделения была использована колонка размером Zorbax Eclipse XDB-C18, (Agilent, США) 150 мм x 4,6 мм x 5 мкм. Температура колонки 30 °С.

Для проведения анализа использованы подвижные фазы: А – 0.1М фосфатный буфер с pH 3 и В - метанол. Скорость потока 0.8 мл/мин.

Градиент подвижной фазы от 10% В (0 мин) для 80% В через 10 мин анализа.

Время интегрирования 10 мин, общее время анализа 15 мин, включая уравнивание колонки начальной подвижной фазой для следующего анализа. Объем пробы 10 мкл. Длина волны детектора 262 нм.

Перед началом определения хроматографическую колонку в течение нескольких часов промывают смесью подвижных фаз А: В (90:10) со скоростью 0,8 мл/мин до формирования стабильной базовой линии.

Приготовление подвижной фазы: А 1,36 г калия фосфата однозамещенного помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяли в 900 мл воды, устанавливали pH 3,0 фосфорной кислотой концентрированной, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. Фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр типа Миллипор (HNWP) с размером пор 0,45 мкм (табл. 19). Хранить в плотно закрытой стеклянной бутылке в течение 1 мес.

Б - метанол

Приготовление стандартного раствора мирамистина: 100 мг стандарта мирамистина (точная навеска) помещали в мерную колбу на 100 мл, добавляют 10 мл воды, перемешивают и доводят объем раствора подвижной фазой А до метки. 0,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки подвижной фазой А.

Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление испытуемого раствора: 1 г (точная навеска) анализируемого образца геля ранозаживляющего помещают в мерную колбу на 100 мл, добавляют 10 мл воды, перемешивали до растворения, доводили до метки подвижной фазой А и фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр типа Миллипор (HNWP) с размером пор 0,45 мкм.

Раствор использовали свежеприготовленным. Состав раствора плацебо представлен в таблице 18.

Таблица 18 – Состав раствора плацебо

Состав	НД	Содержание, г
Комплекс хитозан-химопсин	НД на субстанцию	1,4 (содержание химопсина 0,2)
ПАА	ООО НТФ «Атомбиотех» ТУ 9398-001-059669 19-2008	0,1
ГПМЦ	ID 34680, Coloreon Limited, England	0,9
Глицерин дистиллированный	ЗАО «Аист», Санкт-Петербург	5,0
Вода очищенная		до 100

Таблица 19 – Состав растворов подвижной фазы

Время, мин	Раствор А, %	Раствор Б, %
0	90	10
10	20	80
13	20	80
15	90	10

Относительное время удерживания мирамистина около 7 мин. Было установлено, что используемая колонка обеспечивает симметричный пик на хроматограмме в системе, содержащей элюент А – 0,1М фосфатный буфер рН 3,0 и метанол.

Мирамистин в выбранной системе элюируется в виде симметричного пика, что доказано рассчитанным значением коэффициента асимметрии, который не должен превышать 1,5.

Эффективность хроматографической колонки по пику мирамистина не менее 2000 теоретических тарелок и относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика мирамистина на повторных хроматограммах стандартного раствора, не более 2,0%.

В связи с составом ГЛФ изократическое элюирование становится нецелесообразным, так как более гидрофобные действующие вещества могут накапливаться и искажать результаты последующих анализов.

При анализе применяли градиентный режим элюирования от 10 до 80% ацетонитрила в течение 10 мин, условия которого подобраны экспериментально.

Регистрацию спектров 0,01% раствора мирамистина в воде проводили в интервале длин волн 210–400 нм с шагом 2 нм.

Спектр мирамистина представлен на рисунке 22, длины волн максимального, минимального поглощения мирамистина представлены в таблице 20. На рисунке 23 представлены хроматограммы раствора плацебо, стандартного раствора мирамистина и образца ГЛФ, зарегистрированные при длине волны 262 нм.

Время удерживания мирамистина в разработанной системе 7 мин. Градуировочный график линейен в диапазоне концентраций 1–10 мкг/мл. Воспроизводимость методики оценивали путем параллельных анализов различных образцов ГЛФ.

Значения относительных стандартных отклонений, полученные во всем изученном интервале концентраций, указывают на высокую воспроизводимость методики.

Разработанная методика была использована для определения мирамистина в ГЛФ, результаты представлены в таблице 21. Видно, что относительная ошибка определения исследуемых веществ по разработанной методике не превышает 1,23%.

Проведена валидационная оценка разработанной методики по показателям прецизионность (сходимость, воспроизводимость), правильность, специфичность, линейность. Результаты, представленные в таблице 22 и подтверждают пригодность разработанной методики для анализа.

Относительные стандартные отклонения для площади пиков и времен удерживания действующего вещества в ГЛФ, не превышают критериев оценки.

Методика характеризуется линейностью, воспроизводимостью и точностью определения. Величина относительной систематической ошибки не превышает 2,0% для определения основного вещества.

Подтверждено, что процедура количественного определения мирамистина, его подлинности методом ВЭЖХ в ГЛФ была выполнена правильно и обеспечивает необходимую степень соответствия результатов для ряда измерений, проведенных при многократном отборе проб образцов из серии при разных условиях: разные аналитики, разные дни, разные

хроматографы. Дополнительные пики на хроматограммах не появлялись даже при анализе образцов через более длительный промежуток времени, что свидетельствует о стабильности препарата.

Таблица 20 – Длины волн максимального и минимального поглощения мирамистина

Определяемое соединение	λ макс, нм	λ мин, нм
Мирамистин	262	238

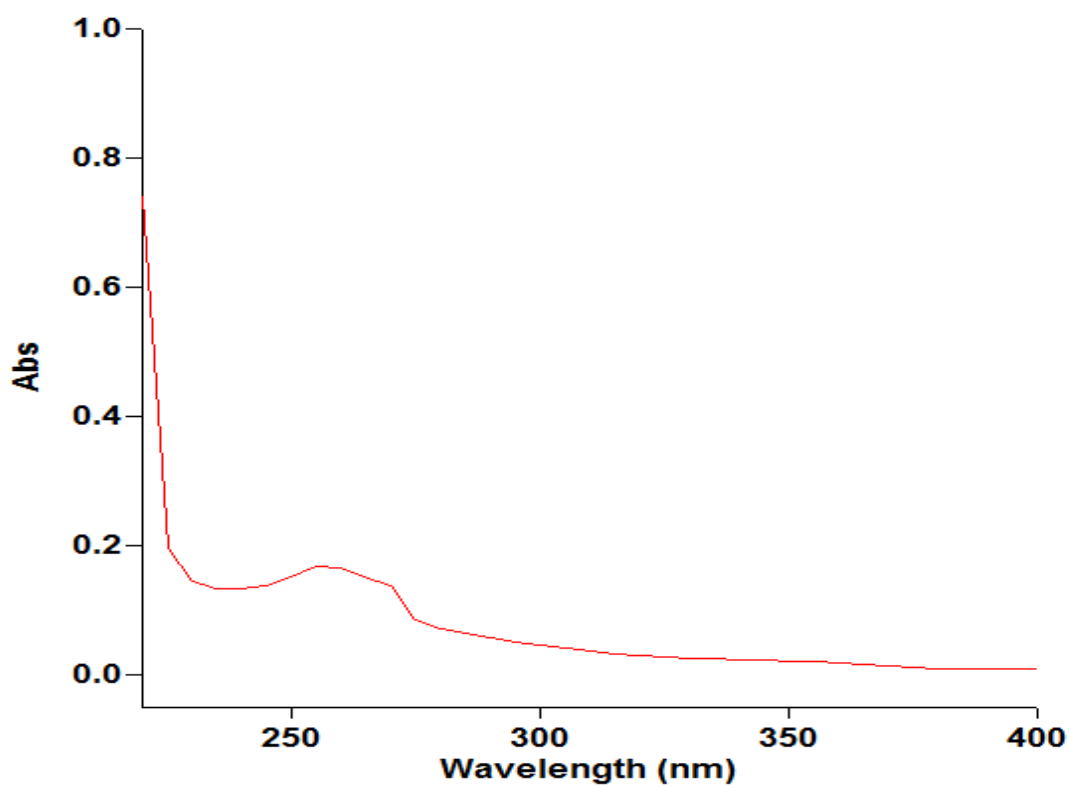
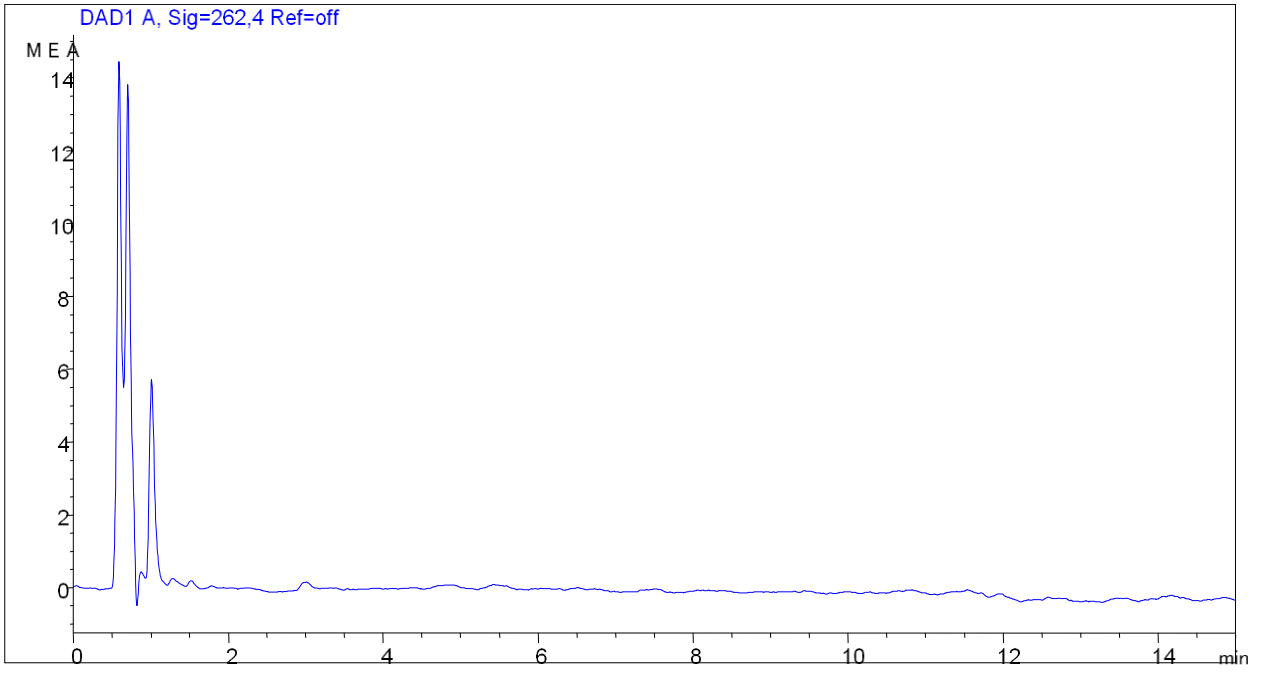
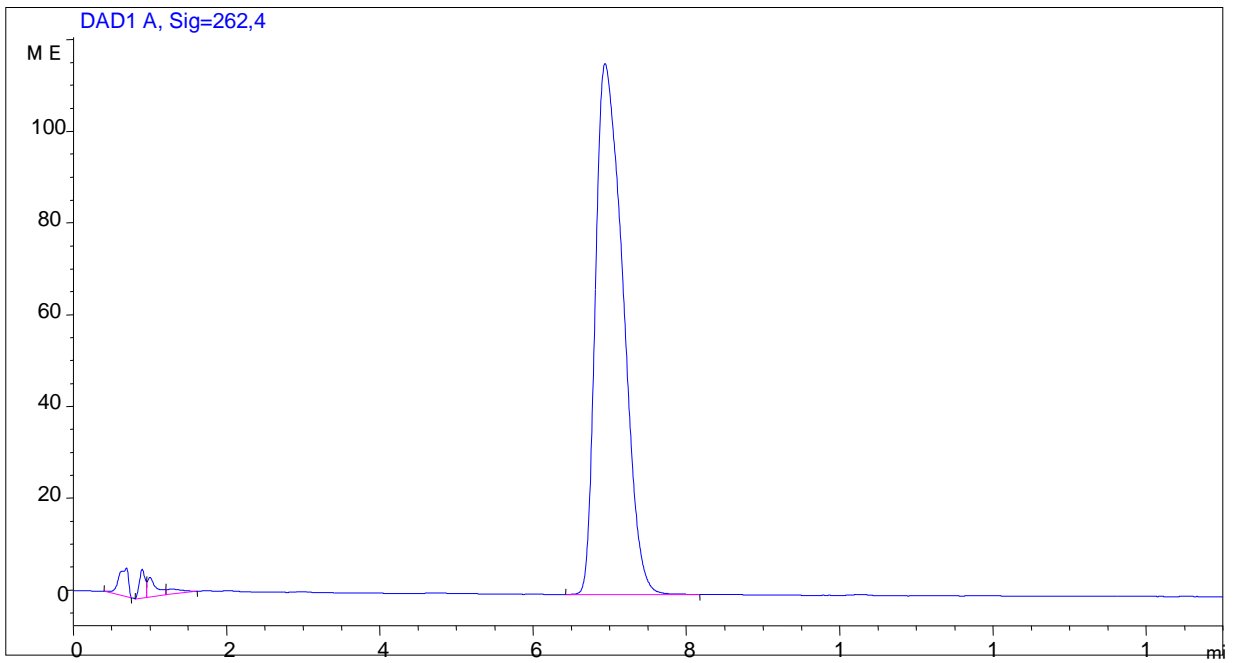


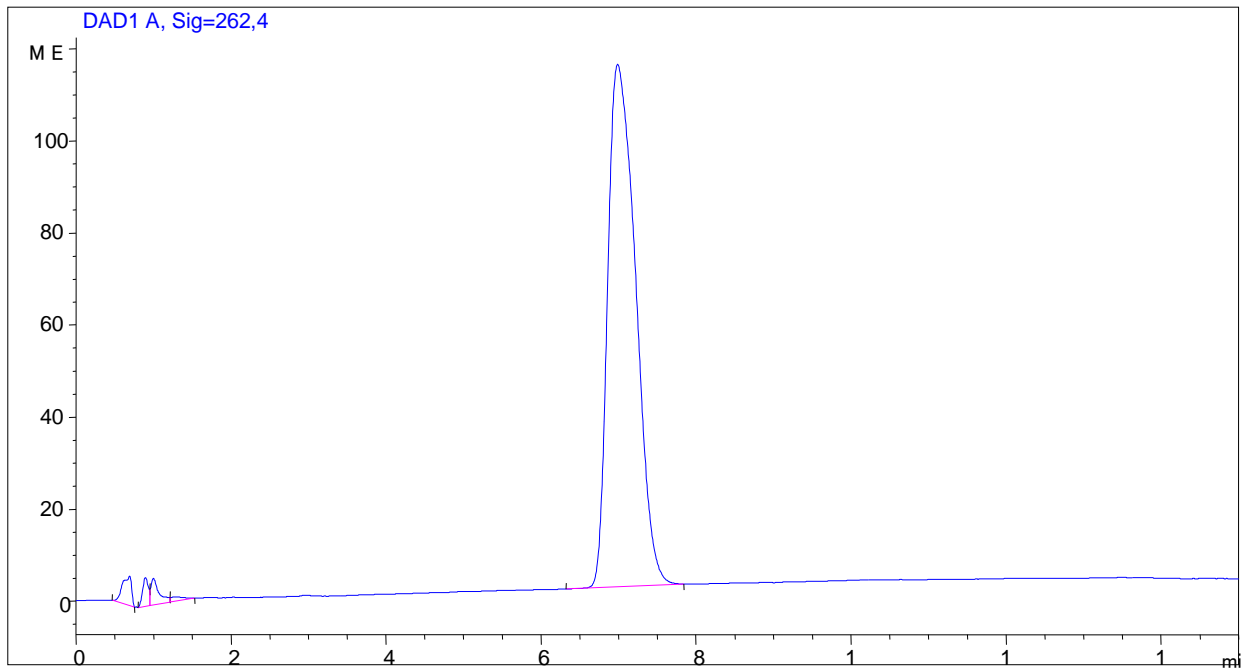
Рисунок 22 - Спектр мирамистина



A



B



С

Рисунок 23 –Хроматограммы раствора плацебо (А), стандартного раствора мирамистина (В) и образца ГЛФ (С)

Таблица 21 – результаты определения мирамистина в ГЛФ

N серии	Метрологические характеристики (n=9, P=95%)						
	Среднее значение, % $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	Сумма квадратов отклонений $\sum \Delta^2$	Дисперсия $V = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$	Стандартное отклонение выборки $S = \sqrt{V}$	Относительное стандартное отклонение $\frac{S}{\bar{x}} \cdot 100, \%$	Полушириина доверительного интервала $\bar{x} - \mu = \pm \frac{t_{P,n} \cdot S}{\sqrt{n}}$	Относительная ошибка среднего значения, % $\frac{\bar{x} - \mu}{\bar{x}} \cdot 100$
01/06032 017	100,84	3,98	0,995	0,997	0,989	1,24	1,23
02/09032 017	100,34	2,32	0,579	0,761	0,758	0,944	0,941

Таблица 22 – Результаты проведения валидационной оценки методики количественного определения мирамистина в геле ранозаживляющем методом ВЭЖХ

Валидационные характеристики	Критерий приемлемости	Полученный результат		Заключение о соответствии
		1	2	
Пригодность хроматографической системы (количественное определение)	эффективность хроматографической колонки не менее 2000	2938	2944	соответствует
	относительное стандартное отклонение не более 2% (площадь пика)	0,35	0,40	соответствует
	относительное стандартное отклонение не более 2% (время удерживания)	0,33	0,63	соответствует
	коэффициент асимметрии пика не более 2,5	1,10	1,20	соответствует
Специфичность	Пики, мешающие определению мирамистина при анализе раствора плацебо отсутствуют	Пики, мешающие определению мирамистина при анализе раствора плацебо отсутствуют		соответствует
Линейность	Для зависимости $Y = a + bx$ коэффициент линейной регрессии $r \geq 0,995$	0,9995		соответствует
	Пересечение с осью Y должно быть не более 2% отклика номинальной концентрации	1,25%		соответствует
Воспроизводимость	Величина систематической ошибки при определении степени близости результатов единичных определений количественного содержания основного вещества в геле ранозаживляющем не превышает 2,0 %	0,59 %		соответствует
Внутрилабораторная прецизионность	Влияние случайных факторов на количественное определение основного вещества является незначимым, если RSD не превышает 2%	1,62%		соответствует
Стабильность раствора	Раствор СО мирамистина должен быть стабильным в течение 3 суток при 5 °С	Стабилен в течение 3 суток		соответствует

Подлинность мирамистина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий» определяли по времени удержания основного пика на хроматограмме:

Время удержания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля должно соответствовать времени удержания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца мирамистина.

Относительное время удерживания мирамистина около 7 мин.

Требуемое значение показателя качества. Содержание мирамистина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий»: от 95 до 105% от заявленного количества.

4.2.4 Методика количественного определения лидокаина методом ВЭЖХ в ГЛФ

Была разработана методика качественного и количественного определения лидокаина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий». Лидокаин является действующим веществом разрабатываемого ЛП.

Хроматографическое разделение проводили на хроматографе Agilent 1200, оснащенном четырехканальным градиентным насосом, автосамплером, термостатом колонок и образцов, спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны.

Для обработки результатов использовали программное обеспечение Agilent Chem Station (ver. B.04.03) и Excel. Для подготовки пробы использовали аналитические весы A&D GR-200, Япония, рН/мВ-метре 330i, (WTW, Германия).

Для разделения использована колонка размером Zorbax Eclipse XDB-C18, (Agilent, США) 150 мм x 4,6 мм x 5 мкм. Температура колонки 30 °С.

Для проведения анализа были использованы подвижные фазы: А – 0.1М фосфатный буфер с рН 3 и В - ацетонитрил. Скорость потока 0,8 мл/мин.

Градиент подвижной фазы от 2% В (0 мин) для 60% В через 10 мин анализа. Время интегрирования 10 мин, общее время анализа 15 мин, включая уравнивание колонки начальной подвижной фазой для следующего анализа. Объем пробы 10 мкл. Длина волны детектора 210 нм.

Перед началом определения хроматографическую колонку в течение нескольких часов промывали смесью подвижных фаз А: В (98:2) со скоростью 0,8 мл/мин до формирования стабильной базовой линии.

Приготовление стандартного раствора лидокаина. 100 мг стандарта лидокаина (точная навеска) помещали в мерную колбу на 100 мл, добавляли 10 мл метанола, перемешивали и доводили объем раствора подвижной фазой А до метки. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили до метки подвижной фазой А.

Приготовление испытуемого раствора. 1 г анализируемого образца (точная навеска) ГЛФ помещали в мерную колбу на 100 мл, добавляли 10 мл воды, перемешивали до растворения, доводили до метки подвижной фазой А и фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр типа Миллипор (HNWP) с размером пор 0,45 мкм.

Приготовление раствора плацебо. Раствор плацебо соответствует по составу основе геля без лидокаина.

Для приготовления исходного раствора взвешивали (точная навеска) 0,2 г химопсина, 1,0 г Хт, 0,3 мл ледяной уксусной кислоты, 0,1 г ГПМЦ и 0,9 г глицерина в колбу на 100 мл и растворяли в воде дистиллированной. Далее 1,0 мл исходного раствора разбавляли до 100 мл подвижной фазой А.

Регистрацию спектров 0,01% раствора лидокаина гидрохлорида в воде проводили в интервале длин волн 210–500 нм с шагом 2 нм.

Спектр лидокаина представлен на рисунке 24, длина волны максимального поглощения лидокаина была 333 нм, а длина волны минимального поглощения лидокаина составило 324 нм. На рисунке 25 представлены хроматограммы раствора плацебо, стандартного раствора лидокаина и образца ГЛФ зарегистрированные при длине волны 210 нм.

Время удерживания лидокаина в разработанной системе 4 мин.

Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций 1–10 мкг/мл. Подобранные условия в дальнейшем были использованы для определения подлинности и количественного определения лидокаина в образце ГЛФ.

В качестве стандартного образца сравнения применяли фармацевтическую субстанцию лидокаина.

Воспроизводимость методики оценивали путем параллельных анализов различных образцов ГЛФ. Значения относительных стандартных отклонений, полученные во всем изученном интервале концентраций, указывают на высокую воспроизводимость методики.

Разработанная методика использовалась для определения лидокаина в ГЛФ, результаты представлены в таблице 23.

Видно, что относительная ошибка определения исследуемых веществ по разработанной методике не превышает 1,46%.

Проведена валидационная оценка разработанной методики по показателям прецизионность (сходимость, воспроизводимость), правильность, специфичность, линейность. Результаты представлены в таблице 24 и подтверждают пригодность разработанной методики анализа.

Относительные стандартные отклонения для площади пиков и времен удерживания основного вещества в геле ранозаживляющем, не превышают критериев оценки.

Методика характеризуется линейностью, воспроизводимостью и точностью определения. Величина относительной систематической ошибки не превышает 2,0% для определения основного вещества.

Подтверждено, что процедура количественного определения лидокаина, его подлинности методом ВЭЖХ в ГЛФ выполняется правильно и обеспечивает необходимую степень соответствия результатов для ряда измерений, проведенных при многократном отборе проб образцов при разных условиях: разные аналитики, разные дни, разные хроматографы.

Дополнительные пики на хроматограммах не появлялись даже при анализе образцов через более длительный промежуток времени, что свидетельствует о стабильности препарата.

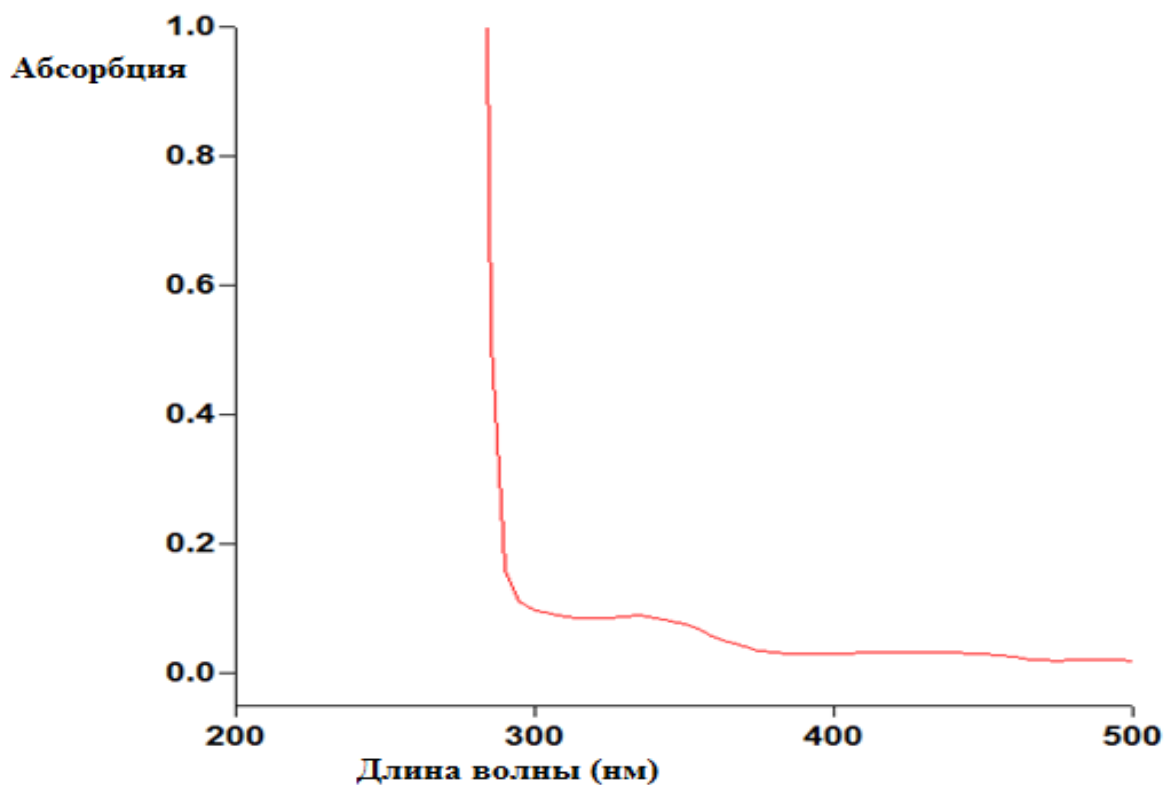
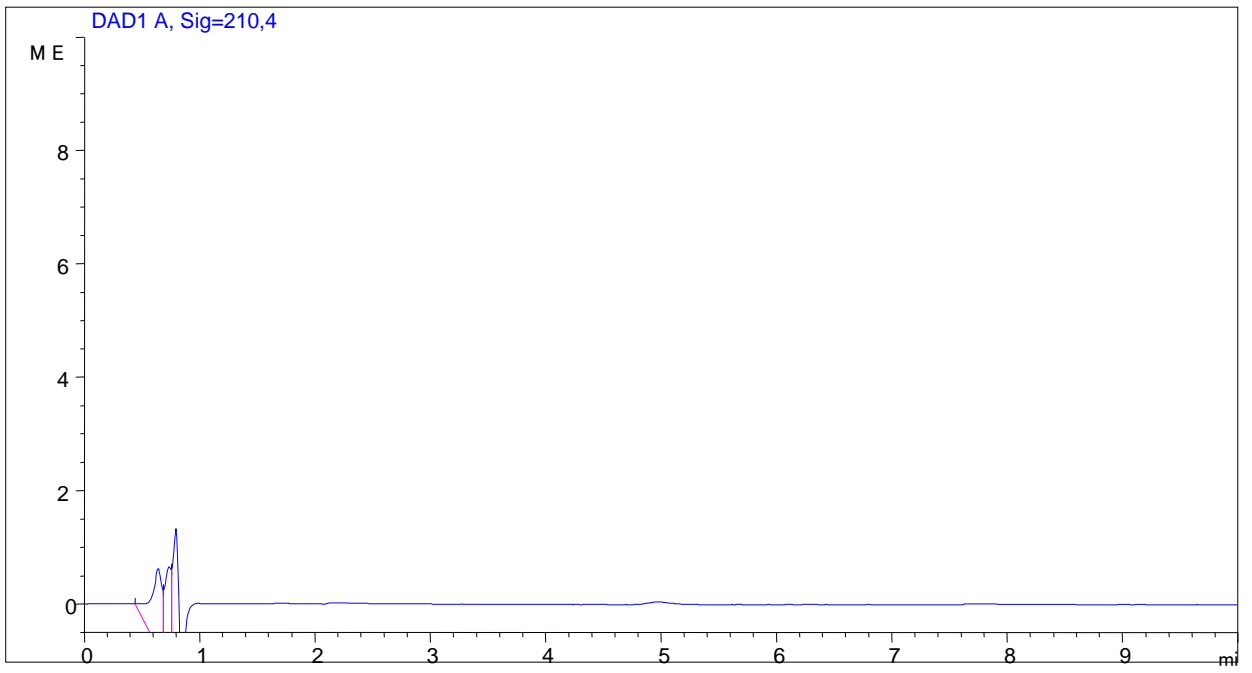
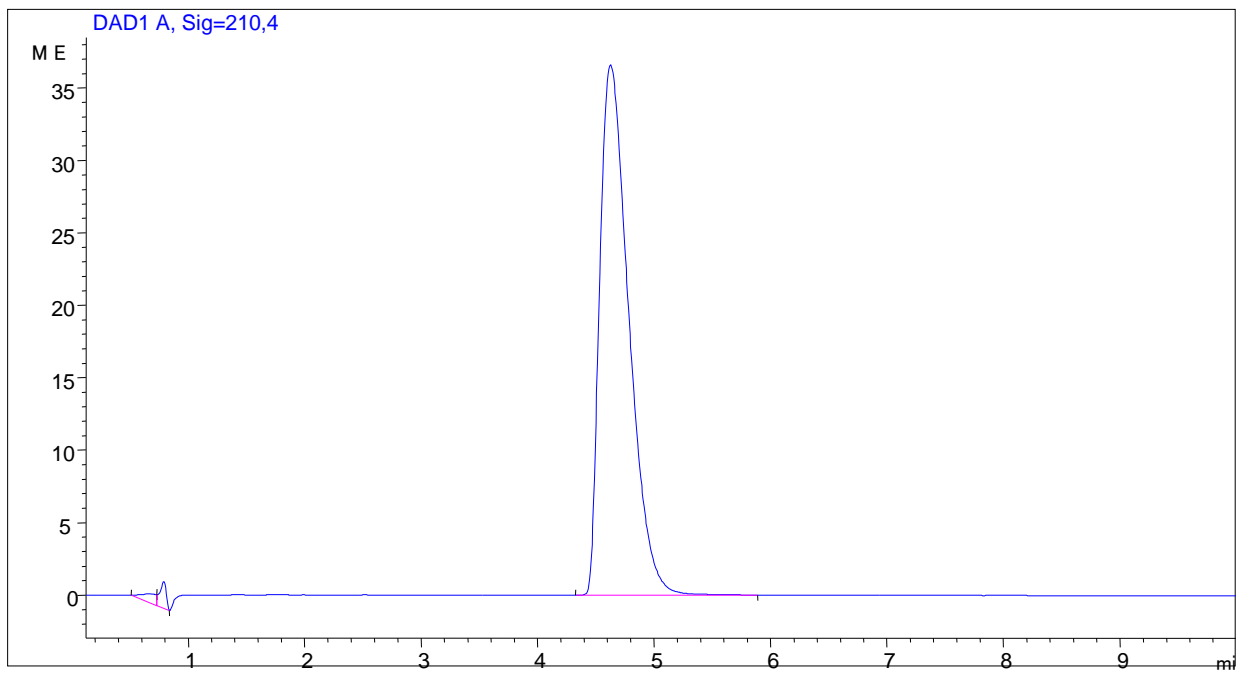


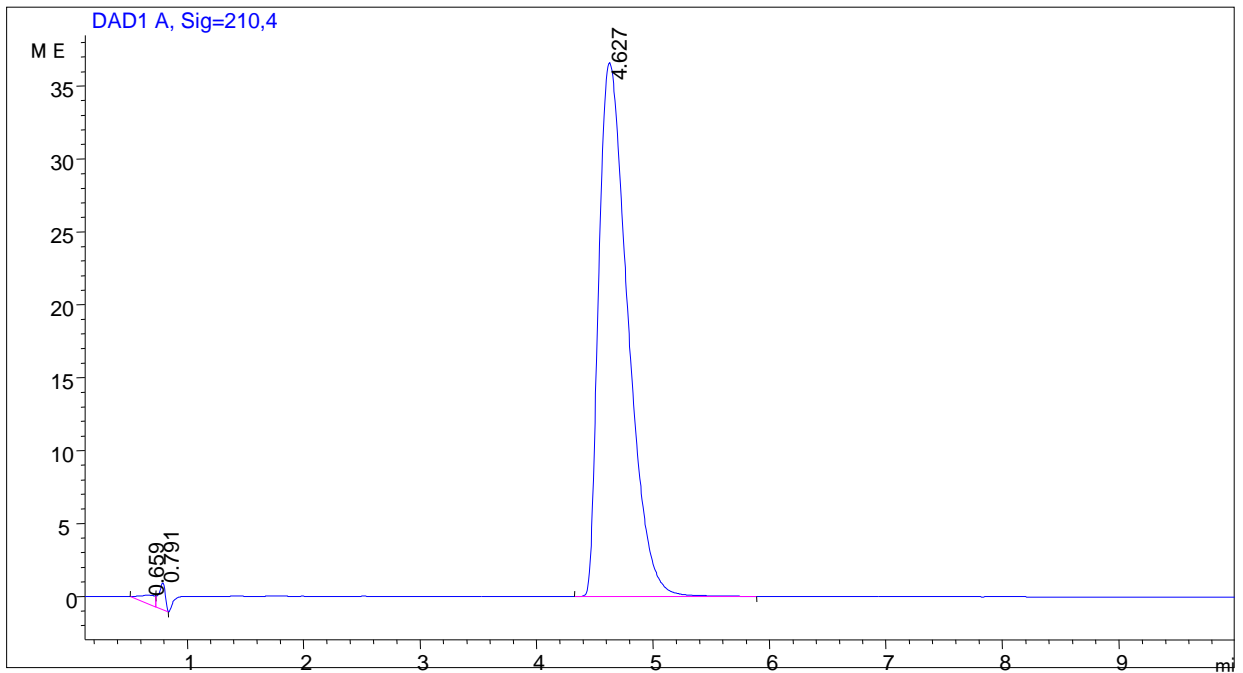
Рисунок 24 – Спектр лидокаина гидрохлорида



A



B



С

Рисунок 25 – Хроматограммы раствора плацебо (А), стандартного раствора лидокаина (В) и образца ГЛФ (С)

Таблица 23 – Результаты количественного определения лидокаина в ГЛФ

N серии	Метрологические характеристики (n=9, P=95%)						
	Среднее значение, % $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	Сумма квадратов отклонений $\sum \Delta^2$	Дисперсия $V = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$	Стандартное отклонение выборки $S = \sqrt{V}$	Относительное стандартное отклонение, $\frac{S}{\bar{x}} \cdot 100, \%$	Полуширина доверительного интервала $\bar{x} - \mu = \pm \frac{t_{p,f} \cdot S}{\sqrt{n}}$	Относительная ошибка среднего значения, % $\frac{\bar{x} - \mu}{\bar{x}} \cdot 100$
01/06032 017	100,77	2,74	0,686	0,828	0,834	1,03	1,04
02/09032 017	99,93	3,94	0,985	0,992	0,986	1,23	1,22

Таблица 24 – Результаты проведения валидационной оценки методики количественного определения лидокаина в ГЛФ

Валидационные характеристики	Критерий приемлемости	Полученный результат		Заключение о соответствии
		1	2	
Пригодность хроматографической системы (количественное определение)	эффективность хроматографической колонки не менее 2000	2700	2630	соответствует
	относительное стандартное отклонение не более 2% (площадь пика)	0,35	0,64	соответствует
	относительное стандартное отклонение не более 2% (время удерживания)	0,18	0,19	соответствует
	коэффициент асимметрии пика не более 2,5	0,98	0,98	соответствует
Специфичность	Пики, мешающие определению лидокаина при анализе раствора плацебо отсутствуют	Пики, мешающие определению лидокаина при анализе раствора плацебо отсутствуют		соответствует
Линейность	Для зависимости $Y = a + bx$ коэффициент линейной регрессии $r \geq 0,995$	0,9995		соответствует
	Пересечение с осью Y должно быть не более 2% отклика номинальной концентрации	0,47%		соответствует
Воспроизводимость	Величина систематической ошибки при определении степени близости результатов единичных определений количественного содержания основного вещества в геле ранозаживляющем не превышает 2,0%	0,35%		соответствует
Внутрилабораторная прецизионность	Влияние случайных факторов на количественное определение основного вещества является незначимым, если RSD не превышает 2,0%	1,46%		соответствует
Стабильность раствора	Раствор СО лидокаина должен быть стабильным в течение 3 суток при 5 °С	Стабилен в течение 3 суток		соответствует

Подлинность лидокаина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий» определяли по времени удержания основного пика на хроматограмме: Время удержания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора ГЛФ должно соответствовать времени удержания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца лидокаина. Относительное время удерживания лидокаина около 4 мин.

Требуемое значение показателя качества. Содержание лидокаина в ГЛФ «Гель ранозаживляющий»: от 95 до 105% от заявленного количества.

4.2.5 Методика определения эффективной вязкости ГЛФ

Была разработана методика определения эффективной вязкости ГЛФ «Гель ранозаживляющий» представляющего собой гелеобразную гомогенную массу без механических включений, молочно-белого цвета, без запаха, разработанный на основе высокомолекулярных полисахаридов и полимеров. ГЛФ относится к псевдопластичным жидкостям, характеризующимся структурной или эффективной вязкостью. Определение эффективной вязкости экспериментальных образцов ГЛФ «Гель ранозаживляющий» проводили с помощью ротационного вискозиметра Rheotest RN4.1 с программным обеспечением, используя цилиндрические измерительные устройства. Принцип действия ротационного вискозиметра заключается в измерении напряжения сдвига в жидкой среде, заключенной между двумя коаксиальными цилиндрами, один из которых вращается двигателем, а второй приводится во вращение первым. Вязкость (структурная, эффективная или кажущаяся) характеризуется углом, на который поворачивается второй цилиндр. Этот угол пропорционален моменту силы, выраженному в ньютон-метрах (Н·м). Угловая скорость вращающегося цилиндра может варьироваться в широких пределах. Вращающий момент в измерительной системе, пропорциональный тангенциальному напряжению в кольцевом зазоре, измеряется и преобразуется в электрический сигнал. Результат измерения регистрируется и выводится на дисплей прибора.

Требуемое значение показателя качества. Эффективная вязкость ГЛФ должна быть в интервале от 0,7 до 1,2 Па·с.

4.3 Разработка проекта нормативной документации на ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

Проект нормативной документации (НД) на ГЛФ «Гель ранозаживляющий» был составлен впервые в соответствии с требованиями Руководства по экспертизе лекарственных средств под редакцией А.Н. Миронова, том II, 2013 г., Государственной фармакопеи Российской

Федерации XIV издания (ГФ РФ), Европейской фармакопеи 8.0 издания (ЕФ 8.0), 2015 г. и Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения», а также Руководства ICH «Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A» («Спецификации: аналитические методики и критерии приемлемости новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов: химические вещества»).

ГЛФ «Гель ранозаживляющий» была разработана на основе инновационных фармацевтических субстанций: комплекс хитозан-химопсин и комплекс хитозан-мирамистин в ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Субстанции комплекс хитозан-химопсин и комплекс хитозан-мирамистин являются оригинальными по составу и способу получения.

ГЛФ «Гель ранозаживляющий» представляет собой комбинированное лекарственное средство действующими веществами которого являются две инновационные субстанции: протеолитический комплекс хитозан-химопсин и антимикробный комплекс хитозан-мирамистин и анестетик – лидокаин.

При разработке проекта НД на ГЛФ с целью выбора оптимальных показателей качества были проведены информационно-аналитические исследования отечественных и зарубежных фармакопейных требований.

На основании проведенных исследований были выбраны следующие показатели качества (табл. 25):

1. Описание;
2. Подлинность;
3. Масса (объем) содержимого упаковка;
4. pH;
5. Вязкость динамическая;
6. Микробиологическая чистота;
7. Количественное определение;
8. Упаковка;
9. Маркировка;
10. Хранение;
11. Срок годности.

Таблица 25 - Спецификация

Показатель	Метод	Норма
Описание	Визуальный Органолептический ГФ РФ ОФС.1.1.0001.18	Гомогенный гель молочно-белого цвета, без запаха
Подлинность Химопсин	А. Протеолитическая активность, спектрофотометрический метод Б. Качественная реакция на химопсин	должен обладать протеолитической активностью должен обладать способностью створаживать молоко за время не более 50 сек
Мирамистин	А. ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля, для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО мирамистина
Лидокаин	А. ВЭЖХ Б. Качественная реакция с кобальта хлоридом	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля, для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме СО лидокаина Появление ярко-зеленого окрашивания
Масса (объем) содержимого упаковки	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007.15	Среднее значение массы содержимого упаковки не должно быть менее 95,0% от указанной массы
рН	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004.15 Потенциометрический	от 5,1 до 5,3 (1,0 % водный раствор)
Вязкость	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0015.15	от 0,70 до 1,2 Па·с
Микробиологическая чистота	ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 2
Количественное определение: Химопсин	Протеолитическая активность - Спектрофотометрический	Не менее 2,0±0,5 ПЕ на 1 мг химопсина

Мирамистин	ВЭЖХ	от 95 до 105% от заявленного количества
Лидокаин	ВЭЖХ	от 95 до 105% от заявленного количества
Упаковка	ГЛФ упаковывают в тубы. Тубы вместимостью 30,0 г (тубы AVL, диаметр тубы - 25 мм), с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой. Каждую тубу вместе с инструкцией по применению помещают в картонную пачку.	
Маркировка	На этикетке контейнера на русском языке указывают: наименование и логотип владельца РУ, наименование, адрес предприятия – производителя, торговое наименование лекарственного препарата, регистрационный номер, количество в упаковке в граммах, условия хранения, номер серии, срок годности.	
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С	
Срок годности	2 года	

Упаковка: ГЛФ упаковывают в тубы. Тубы вместимостью 30,0 г (тубы AVL, диаметр тубы - 25 мм), с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой. Каждую тубу вместе с инструкцией по применению помещают в картонную пачку.

Маркировка: На этикетке контейнера на русском языке указывают: наименование и логотип владельца РУ, наименование, адрес предприятия – производителя, торговое наименование ЛП, регистрационный номер, количество в упаковке в граммах, условия хранения, номер серии, срок годности.

Хранение: В сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности: 2 года.

4.4 Исследование стабильности в процессе хранения ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

Целью изучения стабильности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» является получение информации о том, каким образом меняется качество с течением времени под влиянием факторов окружающей среды: температуры, влажности, освещения. Для этого используются различные методы: стресс - испытания, ускоренные испытания и исследования в реальном времени или долгосрочные исследования. Долгосрочные испытания рассматриваются в качестве основного метода установления и подтверждения сроков годности, как первоначальных, так и после изменения условий производства. Они проводятся в условиях, максимально приближенных к предполагаемым условиям хранения ГЛФ. Полученные данные используются для установления рекомендованных условий хранения и сроков годности ГЛФ. Полной информацией, на основании которой устанавливается окончательный срок годности или период переконтроля, считаются результаты долгосрочных испытаний образцов трех серий,

изготовленных в условиях полномасштабного производства. Их продолжительность должна соответствовать как минимум полному сроку годности. Образцы лекарственных средств, находящиеся на изучении их стабильности, подлежат проверке по показателям качества НД в следующие сроки:

- 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.

На хранение закладывались три партии препарата серий 01/06032017, 02/09032017, 03/13032017 при температуре от 2 до 8 °С и от 15 до 25 °С. Контролировали следующие показатели качества, представленные в таблице 26, с периодичностью 3 месяца в течение 24 месяцев.

Влажность, при которой проводилось изучение стабильности, от 45 до 60%.

Вид упаковки: Тубы вместимостью 30,0 г (тубы AVL, диаметр тубы - 25 мм), с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой.

Таблица 26

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ГЛФ « ГЕЛЬ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ»											
Срок хранения, мес.	Описание (внешний вид, цвет, запах)	Средняя масса содержимого упаковки, г.	pH	Вязкость геля, Па·с	Микробиологическая чистота	Подлинность по химопсину, сек	Определение протеолитической активности	Подлинность по мирамистину	Содержание мирамистина в геле ранозаживляющем	Подлинность по лидокаину	Содержание лидокаина в геле ранозаживляющем
	Однородная гелеобразная масса со слабым молочно-белым или желтоватым оттенком, без запаха	Не должна быть менее 95,0% от указанной на упаковке	5,1 – 5,3 ед. pH (1,0% водный раствор)	от 0,7 до 1,2	Категория 2	Гель должен створаживать молоко за время не более 50 сек.	Протеолитическая активность геля должна быть не менее 2,0 ± 0,5 ПЕ/г геля или 1,0 ± 0,5 ПЕ/мг фермента	Время удержания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля должно соответствовать времени удержания основного пика на хроматограмме раствора СО мирамистина	от 95,0 до 105,0% от заявленного количества	Время удержания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля должно соответствовать времени удержания основного пика на хроматограмме раствора СО лидокаина	от 95,0 до 105,0% от заявленного количества
Партия № 01/06032017 от 06.03.2017 г. при температуре от 15 до 25 °С											
0	соответствует	10,133	5,1	1,094	соответствует	40,3	4,424 2,210	соответствует	100,8	соответствует	100,7
3	соответствует	10,108	5,2	0,94	соответствует	43,5	4,214 2,110	соответствует	100,2	соответствует	99,9
6	соответствует	10,103	5,2	1,00	соответствует	41,3	4,010 2,000	соответствует	97,5	соответствует	100,3
9	соответствует	10,076	5,3	0,64	соответствует	39,8	2,530	соответствует	97,5	соответствует	99,5

							1,270				
12	соответствует	10,031	5,2	0,53	соответствует	42,6	1,500 0,750	соответствует	97,4	соответствует	99,2
при температуре от 2 до 8 °С											
0	соответствует	10,133	5,1	1,094	соответствует	40,3	4,424 2,210	соответствует	100,8	соответствует	100,7
3	соответствует	10,088	5,2	1,10	соответствует	39,0	4,205 2,150	соответствует	100,5	соответствует	99,8
6	соответствует	10,125	5,2	1,01	соответствует	43,5	4,025 2,100	соответствует	100,5	соответствует	99,8
9	соответствует	10,112	5,2	1,13	соответствует	40,9	3,900 1,950	соответствует	100,1	соответствует	98,6
12	соответствует	10,003	5,2	1,04	соответствует	40,5	3,810 1,900	соответствует	99,4	соответствует	98,1
18	соответствует	10,112	5,1	1,00	соответствует	40,2	3,810 1,900	соответствует	99,3	соответствует	98,0
24	соответствует	10,018	5,1	1,00	соответствует	40,1	3,810 1,900	соответствует	99,4	соответствует	98,1
Партия № 02/09032017 от 09.03.2017 г. при температуре от 15 до 25 °С											
0	соответствует	10,096	5,2	1,05	соответствует	42,7	4,409 2,200	соответствует	100,2	соответствует	102,4
3	соответствует	10,994	5,3	0,89	соответствует	42,7	4,409 2,200	соответствует	98,3	соответствует	97,8
6	соответствует	9,996	5,2	1,05	соответствует	42,4	3,970 1,980	соответствует	99,3	соответствует	96,7
9	соответствует	10,118	5,2	0,62	соответствует	41,5	2,000 1,000	соответствует	98,9	соответствует	96,9
12	соответствует	10,109	5,2	0,53	соответствует	40,4	1,400 0,700	соответствует	98,3	соответствует	96,4
при температуре от 2 до 8 °С											
0	соответствует	10,096	5,2	1,05	соответствует	42,7	4,409 2,200	соответствует	100,2	соответствует	102,4
3	соответствует	9,994	5,1	1,09	соответствует	40,1	4,432 2,230	соответствует	97,8	соответствует	101,1
6	соответствует	10,085	5,1	1,05	соответствует	42,8	4,012 2,050	соответствует	99,3	соответствует	100,8
9	соответствует	10,101	5,2	1,13	соответствует	39,2	3,940 1,970	соответствует	97,6	соответствует	99,8

12	соответствует	10,126	5,2	1,13	соответствует	41,5	3,860 1,930	соответствует	97,5	соответствует	99,2
18	соответствует	10,016	5,2	1,11	соответствует	41,0	3,930 1,990	соответствует	97,4	соответствует	99,0
24	соответствует	10,012	5,2	1,12	соответствует	39,9	3,860 1,910	соответствует	97,4	соответствует	99,0
Партия № 03/13032017 от 13.03.2017 г. при температуре от 15 до 25 °С											
0	соответствует	10,108	5,2	1,09	соответствует	39,0	4,362 2,180	соответствует	98,8	соответствует	98,4
3	соответствует	10,100	5,3	0,90	соответствует	40,3	4,362 2,180	соответствует	99,4	соответствует	100,1
6	соответствует	10,128	5,1	1,07	соответствует	39,5	4,007 2,000	соответствует	100,0	соответствует	98,4
9	соответствует	9,998	5,1	0,60	соответствует	43,6	2,130 1,070	соответствует	99,7	соответствует	98,7
12	соответствует	10,087	5,2	0,51	соответствует	39,7	1,450 0,730	соответствует	99,5	соответствует	98,4
при температуре от 2 до 8 °С											
0	соответствует	10,108	5,2	1,09	соответствует	39,0	4,362 2,187	соответствует	98,8	соответствует	98,4
3	соответствует	10,110	5,2	1,16	соответствует	39,5	4,210 2,150	соответствует	98,3	соответствует	100,4
6	соответствует	10,136	5,2	1,09	соответствует	40,3	3,900 1,990	соответствует	98,9	соответствует	98,6
9	соответствует	10,090	5,1	1,12	соответствует	42,7	3,800 1,900	соответствует	98,2	соответствует	97,9
12	соответствует	10,123	5,1	1,08	соответствует	41,2	3,740 1,870	соответствует	98,1	соответствует	97,9
18	соответствует	10,095	5,0	1,09	соответствует	40,3	3,760 1,880	соответствует	98,1	соответствует	97,8
24	соответствует	10,099	5,1	1,07	соответствует	40,4	3,670 1,770	соответствует	98,0	соответствует	97,8

Исследование фотостабильности ГЛФ

Партии: 01/06032017; 02/09032017; 03/13032017

НД: спецификация

Температура опыта: от 2 до 8 °С; от 15 до 25 °С

Влажность, при которой проводилось изучение стабильности: 60%

Источник света - флуоресцентная лампа искусственного дневного света OSRAM L 36W/77 T8 Fluora мощностью 36 Вт 1400 il, излучение в диапазоне, эквивалентном эмиссионному стандарту D 6 5 /ID 6 5.

Результаты изучения фотостабильности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» представлены в таблице 27.

Таблица 27 - Результаты изучения фотостабильности ГЛФ

№ партии	Описание	Средняя масса содержимого упаковки, г	pH	Вязкость геля, Па·с	Микробиологическая чистота	Подлинность по химопсину, сек	Протеолитическая активность, ПЕ/г геля и ПЕ/мг фермента	Подлинность по мирамистину	Содержание мирамистина, %	Подлинность по лидокаину	Содержание лидокаина, %
температура 15 до 25 °С, 60 суток											
01/0603 2017	Не соответствует	10,076	5,0	0,44	соответствует	79,8	2,00 1,00	соответствует	97,5	соответствует	99,5
02/0903 2017	Не соответствует	10,118	4,9	0,39	соответствует	71,5	2,0 1,0	соответствует	98,9	соответствует	96,9
03/1303 2017	Не соответствует	9,998	4,8	0,40	соответствует	73,6	1,9 0,95	соответствует	99,7	соответствует	98,7
температура от 2 до 8 °С, 90 суток											
01/0603 2017	соответствует	10,112	5,2	1,13	соответствует	50,9	3,00 1,5	соответствует	100,1	соответствует	98,6
02/0903 2017	соответствует	10,101	5,1	1,13	соответствует	34,2	3,14 1,57	соответствует	97,6	соответствует	99,8
03/1303 2017	соответствует	10,090	5,1	1,12	соответствует	48,7	3,00 1,50	соответствует	98,2	соответствует	97,9

В результате проведенных исследований стабильности опытных образцов ГЛФ в процессе долгосрочного хранения в течение 12 месяцев при комнатной температуре от 15 до 25 °С и при температуре от 2 до 8 °С было установлено:

1. Опытные образцы ГЛФ представляют собой однородную гелеобразную массу со слабым молочно-белым или желтоватым оттенком, без запаха.
2. Средняя масса содержимого туба для всех образцов не менее 95% от указанного значения на упаковке.
3. Среднее значение рН 1,0% водного раствора ГЛФ составляет 5,1 - 5,3 ед. рН.
4. Эффективная вязкость ГЛФ находится в пределах от 0,51 до 1,13 Па·с.
5. Микробиологическая чистота опытных образцов ГЛФ соответствует категории 2.
6. Подлинность по химопсину - первые признаки створаживания раствора молока появляются в течение 39,7 – 42,6 сек.
7. Протеолитическая активность испытуемых образцов ГЛФ при температуре от 15 до 25 °С находится в интервале от 0,7 до 0,75 ПЕ/мг, при этом падение ПЕ составило в среднем 50,0% от исходного значения.

Протеолитическая активность испытуемых образцов при температуре от 2 до 8 °С находится в интервале от 1,87 до 1,93 ПЕ/мг, а падение ПЕ составило в среднем 13,5% от исходного значения.

8. Подлинность по мирамистину – время удержания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора ГЛФ соответствует времени удержания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца мирамистина.

Содержание мирамистина через 24 месяца хранения в ГЛФ от 97,4 до 99,5% от заявленного количества.

9. Подлинность по лидокаину - время удержания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора ГЛФ соответствует времени удержания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца лидокаина.

Содержание лидокаина через 24 месяца хранения в ГЛФ от 97,9 до 99,2% от заявленного количества.

10. Как следует из результатов проведенного эксперимента по фотостабильности, ГЛФ не обладает термо- и фото- стабильностью.

Наблюдается заметное падение ПЕ, изменение подлинности по химопсину, незначительное уменьшение рН геля, как при хранении при повышенной температуре, так и на свету.

Выявлены отклонения от требований спецификации в течение проведения исследований по показателям: описание, подлинность по химопсину, количественное определение, рН.

Было сделано заключение, что опытные образцы ГЛФ партий 01/06032017, 02/09032017, 03/13032017 через 24 месяца хранения при заданных температурах по установленным параметрам, определенным в соответствии с методиками анализа контроля качества ГЛФ, соответствуют предъявляемым к ним требованиям в спецификации НД.

Исключение составляли такие параметры, как ПЕ и эффективная вязкость, при хранении при комнатной температуре.

Таким образом, оптимальной рекомендуемой температурой хранения ГЛФ «Гель ранозаживляющий» является температура от 2 до 8 °С.

Выводы к главе 4

1. Разработаны технологическая и аппаратурная схема получения ГЛФ, выбраны оптимальные технологические режимы и определены контрольные точки, выбрана наиболее удобная упаковка в форме туб.

2. Разработан ОПР получения ГЛФ «Гель ранозаживляющий».

3. Разработаны методики анализа (контроля качества) ГЛФ в целях качественного и количественного определения действующих веществ. Выбор методик анализа и адаптирование их основывался на возможности данных методик оценить подлинность ГЛФ по действующим веществам и провести количественное определение.

4. Разработан проект нормативной документации ГЛФ «Гель ранозаживляющий».

5. Проведено исследование стабильности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» и контроль качества опытных образцов через 24 месяца хранения при комнатной температуре от 15 до 25 °С и при температуре от 2 до 8 °С.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведенный информационно-аналитический поиск с целью выявления современной номенклатуры средств, используемых для лечения инфицированных ран различного генеза позволил установить, что используются лекарственные средства и изделия медицинского назначения. Современным подходом в разработке ЛП нового поколения является конструирование ГЛФ на основе субстанций известного спектра действия с использованием современных инновационных технологий, позволяющих получить препараты с высокой терапевтической эффективностью и минимальными побочными эффектами. Одним из направлений поиска эффективного способа лечения инфицированных ран является разработка комбинированных ЛП мультифункционального действия для наружного применения (гелей), содержащих в своем составе несколько действующих веществ. Разрабатываемый ЛП на основе хитозансодержащих фармацевтических субстанций, обладает патентной чистотой, является патентоспособным в соответствии с имеющимся уровнем новизны и изобретательности.

2. Разработан и обоснован состав комбинированного ЛП для наружного применения на основе инновационных хитозансодержащих фармацевтических субстанций комплексов хитозан-химопсин и хитозан-мирамистин. Осуществлен подбор вспомогательных веществ; выбрана полимерная основа для ГЛФ; изучена осмотическая активность исследуемых образцов; изучен процесс набухания полимерных пленок, позволивший выбрать полимерные композиции из ГПМЦ и Хт с небольшим количеством ПАА; изучены реологические свойства образцов; с использованием метода атомно-силовой микроскопии исследована однородность ГЛФ. Для подтверждения фармакологических свойств, изучен механизм действия ГЛФ «Гель ранозаживляющий».

3. Разработана технология получения ГЛФ «Гель ранозаживляющий». Разработаны технологическая и аппаратурная схема получения ГЛФ, выбраны оптимальные технологические режимы и определены контрольные точки, выбрана наиболее удобная упаковка в форме туб. Выявлено, что к критическим характеристикам качества ГЛФ, которые должны обеспечить желаемое качество лекарственного препарата при его производстве относятся: внешний вид, рН водной вытяжки, вязкость, подлинность, микробиологическая чистота. По результатам выполненных исследований получены 3 патента РФ на изобретения.

4. Разработаны методики контроля качества ГЛФ «Гель ранозаживляющий». Выбор методик анализа и соответствие их разработанной ГЛФ основывался на возможности данных методик оценить подлинность ЛП по действующим веществам и провести количественное определение.

5. Проведено исследование стабильности ГЛФ «Гель ранозаживляющий». Опытные образцы геля ранозаживляющего через 24 месяца хранения по всем установленным параметрам,

определенным в соответствии с методиками контроля качества, соответствуют предъявляемым к ним требованиям по спецификации. Результаты проведенного исследования стабильности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» свидетельствуют о том, что по специфическим показателям, таким как протеолитическая активность и эффективная вязкость, оптимальным диапазоном температуры хранения является температура от 2 до 8 °С, в сухом, защищенном от света месте.

6. Разработан проект нормативной документации и ОПР на ЛП для наружного применения «Гель ранозаживляющий».

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ICH	- Международная конференция по гармонизации технических требований для регистрации лекарственных средств для медицинского применения (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
ВЭЖХ	- Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЛФ	- Готовая лекарственная форма
ГПМЦ	- Гидроксипропилметилцеллюлоза
КОЕ	- Колониеобразующие единицы
ЛП	- Лекарственный препарат
ОПР	- Опытно-промышленный регламент
ПАА	- Полиакриламид
ПЕ	- Протеолитические единицы
Хт	- Хитозан

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алипов, В.В. 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 [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2013. – Т. VI, №4. С.411–417.
2. Андрианова, И.Е. Противолучевые свойства хитозана / И.Е. Андрианова // Материалы VI Международ. конф. «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», Москва-Щелково, 22-24 октября 2001. – М.: ВНИРО, 2001. – С.126–127.
3. Ахмед, И.М. Разработка составов, технологии и исследование мазей с эритромицина эстолатом для лечения местных гнойно-воспалительных процессов: дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.01/ Имад Махмуд Ахмед; КГМУ. – К., 2003. – С. 88–92.
4. Ахтямова, Н.Е. Лечение пролежней у малоподвижных пациентов / Н.Е. Ахтямова // РМЖ. – 2015. – №26. – С.1549–1552.
5. Ахтямова, Н.Е. Новые подходы в лечении гнойно-воспалительных процессов кожи и подкожной пациентов / Н.Е. Ахтямова // РМЖ. – 2016. – №8. – С.508–510.
6. Бахрушина, Е.А. Разработка состава и технологии пероральных пролонгированных гелей на основе производных акриловой кислоты: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.01/ Елена Олеговна Бахрушина; ПМГМУ имени И.М. Сеченова. – М., 2017. – С. 104.
7. Белов, А.А. Текстильные материалы, содержащие иммобилизованные гидролазы для медицинских и косметологических целей. Получение. Свойства. Применение / А.А. Белов // LAP LAMBERT Acad. Pub., GmbH & Co. KG. – Germany, 2012. – 242 с.
8. Белов, А.А. Влияние растворов глицерина на ферментативную активность протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба стабилизированного полисахаридными соединениями / А.А. Белов, Е.А. Распопова, А.И. Коротаева // Биохимическая физика: труды XIII Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. – Москва: Российский ун-т дружбы народов, 2013. – С.116–120.
9. Белов, А.А. Исследование свойств немодифицированной и иммобилизованной в хитозановый гель лизоамидазы (Хт-ЛА) / А.А. Белов, Н.С. Марквичев, Е.А. Россинец // Всерос. научно-техническая конф. «Общество-Наука-Инновации» Киров, ВятГУ. – 2010. –Т.2– С.60–63.
10. Белов, А.А. Кинетика инактивации при высушивании полиферментных препаратов гидролаз в условиях моделирующих их использование / А.А. Белов, Н.С. Марквичев, Е.А. Россинец // Биохимическая физика: труды X Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. – Москва: Российский ун-т дружбы народов, 2010. – С.205–206.
11. Белов, А.А. Кинетика термоинактивации протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба стабилизированного полисахаридными соединениями / А.А. Белов, Е.А.

Распопова, А.И. Коротаяева [и др.] // Биохимическая физика: труды XIII Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. – Москва: Российский ун-т дружбы народов, 2013. – С.79–82.

12. Белов, А.А. Медицинские перевязочные материалы, содержащие белковые лекарственные препараты / А.А. Белов // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2012. – Т. 4, №2 (11). – С.6–28.

13. Белов, А.А. Новые текстильные перевязочные материалы на основе биodeградируемых полимеров, содержащих протеиназы, для лечения ран и ожогов / А.А. Белов, А.А. Ванюшенкова, Э.Э. Досадина, А.А. Ханафина // Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Б. М. Костюченка. – 2018. – Т.5, №1. – С.16–26.

14. Белов, А.А. Разработка промышленных технологий получения новых медицинских материалов на основе модифицированных волокнообразующих полимеров, содержащих биологически активные белковые вещества: дис. ... докт. техн. наук: 03.00.23/ Алексей Алексеевич Белов; РХТУ. – М., 2009. – С. 385 .

15. Белов, А.А. Раневые покрытия с контролируемым выделением лекарственного препарата / А.А. Белов, Е.А. Распопова // Сб. науч. трудов «Новые хим.-фарм. технологии». – М. – 2014. – Вып. 1. – С.66–68.

16. Белов, А.А. Хитозансодержащие носители на основе модифицированной целлюлозы для медицинских целей / А.А. Белов, Э.Э. Досадина, Аль Окби Хидаэр Махмуд [и др.]// Сб. науч. трудов «Новые хим.-фарм. технологии». – М. – 2014. – Вып. 1. – С.63–65.

17. Блатун, Л.А. Местное медикаментозное лечение ран / Л.А. Блатун // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2011. – №4. – С.51–59.

18. Бледнов, А.В. Перспективные направления в разработке новых перевязочных средств / А.В. Бледнов // Новости хирургии. – 2006. – Т. 14, №1. – С.9–19.

19. Болгов, А.А. Получение гомологов хитозана и его полимераналогичные превращения: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06/ Алексей Александрович Болгов; РХТУ. – М., 2009. – С. 96-101.

20. Большаков, И.Н. Раневые покрытия на основе коллахита - этап получения и использования дермально-эпидермального эквивалента кожи человека / И.Н. Большаков, Н.С. Горбунов, С.М. Насибов [и др.] // Материалы VII Международ. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», Санкт-Петербург-Репино, 15-18 сентября 2003. – М.: ВНИРО, 2003. – С.136–139.

21. Большаков, И.Н. Использование хитозана и его продуктов при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта / И.Н. Большаков, С.М. Насибов, Е.Ю. Куклин [и др.]

// Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / под ред. К.Г.Скрябина, Г.А.Вихоревой, В.П.Варламова. – М.:Наука, 2002 – С.7–23.

22. Бондарев, С.В. Применение препаратов коллагеназы для лечения ран и рубцов кожи: автореф. дис. ... канд. мед. наук (14.00.27) / Сергей Викторович Бондарев. – Санкт-Петербург, 2008. – 21 с.

23. Быков, В.П. Состояние и перспективы развития производства хитина, хитозана и продуктов на их основе из панциря ракообразных / В.П. Быков // Материалы V Всероссийской конф. «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана», Москва-Щелково, 25-27 мая 1999. – М.: ВНИРО, 1999. – С.15-18.

24. Быкова В.М. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана / В.М. Быкова, С.В. Немцев // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / под ред. К.Г.Скрябина, Г.А.Вихоревой, В.П.Варламова. – М.:Наука, 2002. – С.7–24.

25. Валуева М.И. Технология получения текстильных и гидрогелевых депо-материалов с радиопротекторными свойствами: автореф. дис. ... канд.мед.наук (05.19.02) / Валуева Мария Игоревна. – Иваново, 2014. – 16 с.

26. Валуева, М.И. Исследование эффективности применения материалов «Колегель» в клинической практике для профилактики и лечения лучевых реакций / М.И. Валуева, Т.С. Хлыстова, Н.Д. Олтаржевская [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – Т.13, №1 – 2014. – С.71.

27. Валуева, М.И. Лечебные гидрогелевые материалы различной степени структурирования на основе природных полимеров / М.И. Валуева, Т.С. Хлыстова, И.В. Гусев, [и др.] // Известия высших учебных заведений. Технология легкой промышленности. – 2012. – Т.17, №3. – С.59–61.

28. Варламов, В.П. Место Российской науки в мировом хитозановом буме / В.П.Варламов. – М., 1999. – 7 с.

29. Винник, Ю.С. Современные раневые покрытия в лечении гнойных ран / Ю.С. Винник, И.М. Маркелова, Н.С. Соловьева [и др.]// Новости хирургии. – 2015. – Т.23. – С.552–557.

30. Гальбрайт, Л.С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Л.С. Гальбрайт // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т.7, №1. – С.51–56.

31. Гармонизированное трехстороннее руководство ICH Q6A «Спецификации: процедуры анализа и критерии приемлемости для новых лекарственных веществ и новых лекарственных форм. Химические вещества».

32. Гармонизированное трехстороннее руководство ICH Q8 «Фармацевтическая разработка».

33. Гостищев, В.К. Общая хирургия / В.К. Гостищев. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 1997. – 672 с.
34. Государственный реестр лекарственных средств/ [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru> / Загл. с экрана.
35. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд., / М.: «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2018/ [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php/> Загл. с экрана.
36. Григорьева, М.В. Полимерные системы с контролируемым высвобождением биологически активных соединений / М.В. Григорьева // *Biotechnologia Acta*. – 2011. – Т.4. – №2. – С.9 -23.
37. Григорьян, А.Ю. Лечение гнойных ран с применением многокомпонентных мазей на основе энтеросгеля / А.Ю. Григорьян, А.И. Бежин, Т.А. Панкрушева [и др.] // *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. – 2011. – Т. 15, №316 (111). – С.205–211.
38. Грядских, Д.А. Синтез композиционных аффинных сорбентов с магнитными свойствами и их технологическое использование при изготовлении чумных иммунобиологических препаратов: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Диана Анатольевна Грядских. – Ставрополь, 2004. – 159 с.
39. Грядских, Д.А. Синтез композиционных аффинных сорбентов с магнитными свойствами и их технологическое использование при изготовлении чумных иммунобиологических препаратов: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Диана Анатольевна Грядских; СНИПИ. – Ставрополь, 2004. – С. 153.
40. Гунько, В.Г. Изучение осмотической активности некоторых мазевых основ / В.Г. Гунько, А.А. Гунько, Н.М. Мусиенко // *Химико-фармацевтический журнал*. – 1982. – №3. – С.89–91.
41. Довгилева, О.М. Морфофункциональные аспекты посттравматической регенерации кожи в условиях воздействия хитозаном: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25/ Ольга Михайловна Довгилева; ТГМА. – Тв., 2007. – С. 105-110.
42. Досадина, Э.Э. Возможные механизмы взаимодействия хитозана, целлюлозных носителей и белков протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба / Э.Э. Досадина, А.А. Белов // *Успехи химии и химической технологии*. – 2015. – Т. XXIX, № 8. – С.82–84.
43. Дунаевский, А.М. Клиническое обоснование использования препарата Мирамистин в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний респираторной системы / А.М. Дунаевский, И.М. Кириченко // *Поликлиника*. – 2014. – N 1. – С.66–69.

44. Ефименко, Н. А. Протеолитические энзимы в хирургии: исторические аспекты и современные представления о применении / Н. А. Ефименко, М.В. Лысенко, Ю.И. Стернин // Русский медицинский журнал. – 2011. – Т.19, № 5. – С. 368–372.
45. Ефремов, А.В. Динамика изменения прооксидантной и антиоксидантной активности перитонеальной и бронхоальвеолярной жидкостей у экспериментальных животных после применения общей гипотермии / А.В. Ефремов, А.В.Самсонов, О.Н. Логачева // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – Т. 31, №1. – С. 9–12.
46. Жидкова, Ю.Ю. Разработка состава и фармакотехнологические исследования композитных гелей для профилактики гипертрофических и келоидных рубцов: автореф. дис. ... канд. фарм. наук (14.04.01) / Анна Юрьевна Жидкова. – Пятигорск, 2014. – 22 с.
47. Жоголев К.Д., Хитозан в медицине и рациональном питании / Никитин В.Ю., Цыган В.Н., Егоров В.Н. – Санкт-Петербург: Серия: Медицина XXI века. – 2000. – 24 с.
48. Жоголев, К.Д. Изучение влияния препаратов хитина и хитозана на течение раневого процесса / К.Д. Жоголев, В.Ю. Никитин, Ю.И. Буланьков // Санкт-Петербург: Актуальные проблемы гнойно-септических инфекций. – 1996. – С. 36-37.
49. Жоголев, К.Д. Разработка и изучение некоторых лекарственных форм препаратов на основе хитозана / К.Д. Жоголев, Никитин В.Ю. Цыган В.Н. [и др.] // Материалы VI Международ. конф. «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», Москва-Щелково, 22-24 октября 2001. – М.: ВНИРО, 2001. – С.163–167.
50. Зоткин, М.А. Свойства растворов и пленок солей хитозана с различными кислотами / М.А. Зоткин, Г.А. Вихорева, А. С. Кечекья [и др.] // Материалы VII Международ. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», Санкт-Петербург-Репино, 15-18 сентября 2003. – М.: ВНИРО, 2003. – С.307–311.
51. Измайлов А.Г., Доброквашин С.В., Волков Д.Е., Пырков В.А. и др. Новые подходы в местном медикаментозном лечении ран мягких тканей / А.Г. Измайлов, С.В. Доброквашин, Д.Е. Волков [и др.] // Практическая медицина. – 2015. - №6 (91). С.67–71.
52. Ильина, А.В. Энзимология синтеза и деградации хитина и хитозана / Ильина А.В., Варламов В.П. // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / под ред. К.Г.Скрябина, Г.А.Вихоревой, В.П.Варламова. – М.: Наука, 2002. – С.79–90.
53. ИнтеграПрима – НаноЛаборатория.Описание типа средств измерений для государственного реестра. - М., 2010.- С.4.
54. Иорданишвили, А.К. Экспериментальное изучение влияния на репаративный остеогенез препарата на основе хитозана / А.К. Иорданишвили, Д.Ю. Мадай, В.Г. Голобов [и др.] // Современные принципы и методы лечения стоматологических больных. – СПб., 1994. – С.32–33.

55. Использование хитозана в качестве носителя протеиназ и мирамистина для получения ферментсодержащего геля / Э. Э. Досадина, М. А. Бикинеева, А. Ю. Евдокименко и др. // Бутлеровские сообщения. — 2016. — Т. 48, № 10. — С. 49–59.
56. Коваленко, Г.А. Имобилизованные протеолитические ферменты для наружного применения / Г.А. Коваленко // Химико-фармацевтический журнал. — 1998. — Т.32, №11. — С.41–44.
57. Коваль, Ю.Ф. Медико–биологические аспекты использования хитина, хитозана и их производных/ Ю.Ф.Коваль, К.Д. Жоголев, В.Ю. Никитин [и др.] // Тезисы доклада III Всес. конф. по совершенствованию производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов криля и пути их использования. — М.: ВНИРО. — 1992. — С.30–36.
58. Корнилаева, Г.В. Сульфатированные производные хитозана как ингибиторы ВИЧ–инфекции / Г.В. Корнилаева, Т.В. Макарова, А.И. Гамзаде [и др.] // Иммунология. — 1995. — №1. — С.13–14.
59. Котельникова, Т.А. Закономерности сорбции предельных одноатомных спиртов на полиэлектролитном комплексе хитозана и полиакриловой кислоты по данным газовой хроматографии / Т.А. Котельникова, М.А. Смирнов, Е.П. Агеев [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия — 2003. — Т. 44, №4. — С.249–252.
60. Левитин, С.В. Разработка методов получения и исследование структуры и свойств наночастиц хитозана: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.17.06 / Сергей Вадимович Левитин. — Москва, 2015. - 17 с.
61. Лидокаин // Википедия. [2019—2019]. Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/?oldid=102079323> (дата обращения: 09.11.2017).
62. Липатов, К.В. Этиопатогенетические особенности хирургической инфекции мягких тканей / К.В. Липатов, Е.А. Стан, О.В. Введенская [и др.] // Хирургия. — 2013. — №5. — С.48–54.
63. Луцевич, О.Э. Современный взгляд на патофизиологию и лечение гнойных ран / О.Э. Луцевич, О.Б. Тамразова, А.Ю. Шikuнова // Хирургия. — 2011. — №5. — С.72–77.
64. Марквичева, Е.А. Клетки, белки, пептиды, иммобилизованные в композитные гидрогели: получение, свойства, применение в биотехнологии и биомедицине: автореф. дис. ... д-ра хим. наук (03.00.04) / Елена Арнольдовна Марквичева. — Москва, 2005. — 50 с.
65. Материалы VI Международ. конф. «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», Москва-Щелково, 22-24 октября 2001. — М.: ВНИРО, 2001. — 398 с.
66. Материалы VII Международ. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», Санкт-Петербург-Репино, 15-18 сентября 2003. — М.: ВНИРО, 2003. — 446 с.

67. Материалы VIII Международ. конф. «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», Казань, 12-15 июня 2006. – М.: ВНИРО, 2006. – 401 с.
68. Медушева, Е.О. Производные диальдегидцеллюлозы, модифицированные биологически активными веществами / Е.О. Медушева, В.Н. Филатов, В.В. Рыльцев [и др.] // Фармация. – 2016. – №1. – С.52–56.
69. Медушева, Е.О. Разработка, экспериментальное обоснование и внедрение в хирургическую практику раневых покрытий, обладающих комплексным некролитическим, антибактериальным и антиоксидантным действием (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.27 / Елена Олеговна Медушева. – Москва, 2004. – 371 с.
70. Мельник, И.В. Применение хитозана и его производных для концентрирования баксуспензий / И.В. Мельник, Н.Д. Скичко, Е.А. Шубина [и др.]// Материалы V Всероссийской конф. «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана», Москва-Щелково, 25-27 мая 1999. – М.: ВНИРО, 1999. – С.170–172.
71. Методические рекомендации № 2000/156. Биологически активные перевязочные средства в комплексном лечении гнойно-некротических ран. – М.: МЗ РФ. – 2000. – 37 с.
72. Мирамистин// Википедия. [2019-2019] Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/?oldid=101954491> (дата обращения: 03.09.2017).
73. Михальский, В. В. Применение препарата Бетадин в лечении инфицированных ран / В. В. Михальский, С. Ю. Горюнов, А. Е. Богданов [и др.] // Русский медицинский журнал. – Т. 18, №29. – С.1780–1783.
74. Нагорнов, Ю.С. Способы исследования поверхности методами атомно-силовой и электронной микроскопии: учебное пособие / Ю. С. Нагорнов, И. С. Ясников, М. Н. Тюрков. – Тольят. гос. ун-т. – Тольятти: Тольяттинский гос. ун-т, 2012. – 58 с.
75. Никитин, В. Г. Вакуум-терапия в лечении ран и раневой инфекции / В. Г. Никитин, В. Н. Оболенский, А. Ю. Семенистый [и др.] // Русский медицинский журнал. – 2010. Т.18, №1. – С.1064–1072.
76. Нудьга, Л.А. Производные хитина и хитозана и их свойства. – В кн.: «Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение» / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. - М.: Наука, 2002. – С.141–177.
77. Оболенский, В.Н. Синдром диабетической стопы: комплексный подход к лечению / В.Н. Оболенский, В.А. Кисляков, И.А. Юсупов // Русский медицинский журнал. – 2015. – №12. – С. 768–770.
78. Пат. 2108114 Российская Федерация, МПК А61L 15/28. Биологическая композиция для лечения ран «Коллахит» / Фрончек Э.В.; заявитель и патентообладатель ТОО НПП «Эрлон». – №96124444/14; заявл. 27.12.1996; опубл. 04.10.1998, Бюл. №3.

79. Пат. 2136265 Российская Федерация, МПК А61К 7/00. Основа для косметических средств / Новик Л.В.; заявитель и патентообладатель Лужский завод белковой колбасной оболочки «Белкозин»– №97113779/14; заявл. 11.08.1997; опубл. 10.09.1999, Бюл. №25.
80. Писаренко, Л.В. О некоторых медико-биологических свойствах хитозана / Л.В. Писаренко, Г.Г. Игнатов, В.В. Анфилов // Материалы VII Международ. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», Санкт-Петербург-Репино, 15-18 сентября 2003. – М.: ВНИРО, 2003. – С.187–189.
81. Привольнов, В.В. Основные принципы местного лечения ран и раневой инфекции / В.В. Привольнов, Е.В. Каракулина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13. – С.214–223.
82. Пурыгин, П.П. Определение токсичности и антиоксидантной активности биомассы спирулины платенсис и лекарственных форм на ее основе / П.П. Пурыгин, Н.Н. Желонкин, О.Н. Павлова [и др.] // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. – 2007. – №6(56). – С.393–400.
83. Пятигорская, Н.В. Исследование и методологические подходы создания современных фармацевтических предприятий Российской Федерации: дис. ... докт.фарм. наук: 14.04.01/ Наталья Валерьевна Пятигорская; ПМГМУ имени И.М. Сеченова. – М., 2011. – С. 225.
84. Рабинович, М.И. Применение хитозана фармакокорректора содержания тяжелых металлов в организме животных на Южном Урале / М.И. Рабинович, А.Р. Таирова // Материалы V Всероссийской конф. «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана», Москва-Щелково, 25-27 мая 1999. – М.: ВНИРО, 1999. – С.186–188.
85. Регистр лекарственных средств России / [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.rlsnet.ru/> / Загл. с экрана.
86. Рекомендуемые требования к качеству лекарственных средств // Режим доступа: <https://helpiks.org/6-69650.html> (дата обращения: 04.10.2017).
87. Роговина, С.З. Свойства пленок, полученных из смесей целлюлозы и хитозана / С.З. Роговина, Г.А. Вихорева, Т.А. Аكوпова [и др.] // Высокомолекулярные соединения. – 1999. – Т.41, №11. – С.1839–1842.
88. Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая // Под общ. ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012, 944 с.
89. Сарибекова, Д.Г. Изучение методом ИК-спектроскопии механизма придания кислотозащитных свойств фторорганическими препаратами / Д.Г. Сарибекова, Г.А. Скрипко // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2011. – Т.6, № 6(54). – С.60–68.
90. Сафронова, Т.М. Хитозан как флокулянт нативного рыбного белка / Т.М. Сафронова, Т.М. Бойцова // Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы V науч.-техн. конф. – М.: Изд-во ВНИРО, 1999. – С.251–252.

91. Симонова, Л.В. Хитин и хитозан / Л.В. Симонова, Л.К. Пашук // Косметика и медицина. – 1998. – №1. – С.12–14.
92. Скворцов, В.Ю. Влияние хитозана на индукцию иммунного ответа на эритроциты барана в сингенной и аллогенной системах переноса «иммунных» макрофагов / В.Ю. Скворцов, Т.В. Мастернак, Е.А. Кириллина [и др.] // Иммунология. – 1985. – № 5. – С.79–81.
93. Сливкин А.И. Синтез лекарственных аналогов хитозана / А.И. Сливкин, В.Л. Лапенко, А.А. Болгов //Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – №2. – С.205–208.
94. Сливкин А.И., Лапенко В.Л., Арзамасцев А.П., Болгов А.А. Аминоглюканы в качестве биологически активных компонентов лекарственных средств (обзор за период 2000-2004). – Вестник ВГУ. – 2005. – Сер. Химия. Биология. Фармация. – №2. – С. 73 – 87.
95. Сливкин А.И., Лапенко В.Л., Болгов А.А. Синтез лекарственных аналогов хитозана. – Вестник ВГУ. – 2005. – Сер. Химия. Биология. Фармация. – №2. – С. 205 – 208.
96. Сливкин, А.И. Аминоглюканы в качестве биологически активных компонентов лекарственных средств (обзор за период 2000-2004) / А.И. Сливкин, В.Л. Лапенко, А.П. Арзамасцев [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – №2. – С.73–87.
97. Современные раневые покрытия в местном лечении ран различного генеза / Д. В. Шаблин [и др.] // Фундам. исследования. – 2013. – № 12-2. – С. 361– 365.
98. Стручков, В.И. Руководство по гнойной хирургии / В.И. Стручков, В.К. Гостищев, Ю.В. Стручков. – М.: Медицина, 1984. – 512 с.
99. Суковатых, Б.С. Имобилизованная форма хлоргексидина биглюконата в комплексном лечении гнойных ран / Б.С. Суковатых, Т.А. Панкрушева, Е.Г. Андрюхина [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2013. – Т. 6, №4. – С.406-410.
100. Тесленко, А.Я. Использование хитинсодержащих сорбентов для решения экологических задач / А.Я. Тесленко, И.Н. Воеводина, С.В. Николаева // Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов крыля и пути их использования. – М.: ВНИРО, 1992. – С.99–104.
101. Толстихина А.Л. Атомно-силовая микроскопия кристаллов и пленок со сложной морфологией поверхности: дис. ... д-ра физ.- мат. наук: 01.04.18 / Алла Леонидовна Толстихина. – Москва, 2013. - 333 с.
102. Толстых П. И. Дренирование в акушерстве и гинекологии / Толстых П. И., Иванян А. Н. – Москва-Смоленск, 2000. - 295 с.
103. Тюпенко, Г.М. Электрофорез хитозана при заболеваниях пародонтоза / Г.М. Тюпенко, Е.Е. Скорикова, А.Б. Зенин // Материалы VI Международ. конф. «Новые достижения в

исследовании хитина и хитозана», Москва-Щелково, 22-24 октября 2001. – М.: ВНИРО, 2001. – С.241–247.

104. Фомина, Е.В. Технология получения лечебных текстильных материалов для физиотерапии: дис. на соис. уч. степ. канд. техн. наук: 05.19.02/ Елена Викторовна Фомина; Моск. гос. ун-т. дизайна и технологий. — М., 2014. – С. 167.

105. Хацаева Т.М. Лечение воспалительных заболеваний пародонта комплексными иммобилизованными препаратами: автореф. дис. ... канд. мед. наук (14.01.14) / Тамила Мусаевна Хацаева. – Москва, 2013. – 27 с.

106. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / под ред. К.Г.Скрябина, Г.А.Вихоревой, В.П.Варламова. - М.: Наука, 2002. – 368 с.

107. Хитин и хитозан: природа, получение и применение: матер. проекта CYTED IV. 14: Хитин и хитозан из отходов переработки ракообразных / под ред. Ana Pastor de Abram пер. К.М. Михлиной, Е.В. Жуковой, Е.С. Крыловой; науч. ред.: В.П. Варламов, С.В. Немцев, В.Е. Тихонов// Российское хитиновое общество. Щелково, 2010. – 292 с.

108. Цыган, В.Н. Хитозан как парафармацевтик / В.Н. Цыган, К.Н. Жоголев, В.Ю. Никитин // Рынок БАД. – 2002. – №2(4). – С.8.

109. Червинец, В.М. Антимикробная активность хитозана с разной молекулярной массой / В.М. Червинец, В.М. Бондаренко, А.И. Албулов // Материалы VI Международ. конф. «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», Москва-Щелково, 22-24 октября 2001. – М.: ВНИРО, 2001. – С.252–254.

110. Чирков, С.И. Противовирусные свойства хитозана / С.И. Чирков //Материалы VI Международ. конф. «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», Москва-Щелково, 22-24 октября 2001. – М.: ВНИРО, 2001. – С.120.

111. Шаблин, Д.В. Современные раневые покрытия в местном лечении ран различного генеза / Д.В. Шаблин, С.Г. Павленко, А.А. Евглевский [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. - №2, Ч.2. – С.361–365.

112. Шехтер, А. Б. Воспаление. Руководство для врачей / под. Ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.

113. Шуршина, А.С. Получение ферментсодержащих хитозановых пленок / А.С. Шуршина, Е.И. Кулиш, С.В. Колесов [и др.] //Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – №3. – С.43–45.

114. Юсова, А.А. Исследование физико-механических и транспортных свойств смешанных гидрогелей на основе альгината и высокометоксилированного пектина / А.А. Юсова, И.В. Гусев, И.М. Липатова // Известия Высших учебных заведений. Серия Химия и химическая технология. – 2015. – Т. 58, №4 – С.58–63.

115. Abdel-Rahman, R.M. Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity / R.M. Abdel-Rahman, R. Hrdina and A.M. Abdel-Mohsen et al. // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2015. – Vol. 80. – P.107–120.
116. Balti, R. Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by alcalase and bacillus licheniformis NH1 proteases / R. Balti, A. Bougatef, N.E.H. Ali et al. // *Journal of Amino Acids*. – Vol. 2011. – Article ID 107179. – 11 p.
117. Belov, A.A. Biodegradable enzyme containing biomaterials for wound healing / Belov, A.A., N. S. Markvichev, E. E. Dosadina et al. // *Proc. 7th International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues» (Bionanotox 2016)*, Heraklion, Crete, Greece, May 8-13. – P.33–34.
118. Birge, R.R. Protein-based computers / R.R. Birge // *Scientific American*. – 1995. – Vol. 272. – P.677–680.
119. Bodek, K.H. Evaluation of microcrystalline chitosan properties as a drug carrier. Part II. The influence of microcrystalline chitosan on release rate of keto-profen / K.H. Bodek // *Acta Pol. Pharm.* – 2001. – Vol. 58. – N.3. – P.185–194.
120. Brine, C.G. Utilization of chitin a cellulose derivative from crab and shrimp waste / C.G. Brine, P.R. Austin // *Delaware university project report*. – 1974. – №19. – P.12.
121. Brkich, L.L. Development of composition and manufacturing method for combination drug product based on chitosan-containing pharmaceutical substances / L.L. Brkich, N.V. Pyatigorskaya, G.E. Brkich et al. // *International Journal of Pharmaceutical Research*. – 2018. – Vol. 10 – №4. – P.292-296.
122. Brkich, L.L. Formulation and production of a novel pharmaceutical substance for treatment of infected wounds - a chitosan chymopsin complex / L.L. Brkich, T.S. Salnikova, G.E. Brkich et al. // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2018. – Vol. 10 – №6. – P.1310-1313.
123. Brkich, L.L. Miramistin as an antimicrobial component in the innovative substance of Chitosan-Miramistin Complex (CMC) for the treatment of infected wounds of various genesis / L.L. Brkich, N.V. Pyatigorskaya, G.E. Brkich et al. // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2018. – Vol. 10 – №8. – P. 2027-2029.
124. Domard, A. Some physicochemical and structure basis for applicability of chitin and chitosan / A. Domard // *In the Proceeding of the Second Asia Pacific Symposium Chitin and Chitosan*. – Bangkok. – 1996. – P.1–12.
125. Dong-Zhi, Yang. On the Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan / Yang Dong-Zhi Lin Xiao-Fei, Li Zhi et al. // *Chin. J. Appl. Chem*. – 2000. – Vol. 17, №6. – P. 598–602.

126. Dureja, H. Simulation of skin permeability in chitosan membranes / H. Dureja, A.K. Tiwary, S. Gupta // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2001. – Vol. 213. – P.193–198.
127. Filar, Y. Bulk and solution properties of chitin specific enzyme-linked immunosorbent / Y. Filar, M.C. Winick, A. Freeman // *I. Biotechnol. Biunq.* – 1981. – Vol. 23. – P.31–33.
128. Hackman, R. H. Light-scattering and infrared-spectrophotometric studies of chitin and chitin derivatives / R. H. Hackman, M.Goldberg // *Carbohydrate Research*. – 1974. – №38. – P. 35 – 45.
129. Janes, K.A. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin / K.A. Janes, M.P. Fresneau, A. Marazuela et al. // *J. Control Released*. – 2001. – Vol. 15. – №73(2-3). – P.255–267.
130. Kennedy, J.F. Natural polymers for healing wounds / J.F. Kennedy, G.O. Philips, P.A. Williams et al. // *Recent Advances in Environmentally Compatible Polymers* . – 2001. – P.97–104.
131. Kosaka, T. Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress / T. Kosaka, Y. Kaneko, Y. Nakada et al. // *J. Vet. Med. Sci.* – 1996. – Vol. 58. – № 10. – P.963–967.
132. Kumar, G. Enzymatic grafting of a natural product to chitosan to confer water solubility under basis conditions / G. Kumar, P. Smith, G.F. Payne // *Biotech. Bioeng.* – 1999. – Vol. 63. – №2. – P.154–164.
133. Kumari, P. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method / P. Kumari, P. Rath, A. Sri Hari Kumar et al. // *Environmental Technology & Innovation*. – Vol. 3. – P.77–85.
134. Lim, L.Y. Effects of dry heat and saturated steam on the phased properties chitosan / L.Y. Lim, E. Khor, C.E. Ling // *J. Biomedical materialists research*. – 1999. – Vol. 48. – №2. – P.111–116.
135. Lim, S.T. In vivo evaluation of novel hyaluronan/chitosan microparticulate delivery systems for the nasal delivery of gentamicin in rabbits / S.T. Lim, B. Forbes, D.J. Berry et al. // *Int. J. Pharm.* – Vol. 23. – №1. – P.73–82.
136. Lin, S. B. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity / S. B. Lin, Y. C.Lin, H. H. Chen // *Food Chemistry*. - 2009. – Vol. 116. – Issue 1. – P.47–53.
137. Lindon J. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry - 2nd Edition* / J. Lindon. - Academic Press, 2010. – 3312 p.
138. McCallon, Stanley K. Optimizing wound bed preparation with collagenase enzymatic debridement / Stanley K. McCallon, Dorothy Weir, John C. Lantis // *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*. – 2015. – Vol.6. – P.14–23.
139. Mori, T. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro / T. Mori, M. Okumura, M. Matsuura et al. // *Biomaterials*. – 1997. – Vol. 18. – №13. – P.947–951.

140. Murata, J. Inhibition of tumor cell arrest in lungs by antimetastatic chitin heparinoid / J. Murata, I. Saiki, K. Matsuno et al. // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1990. – Vol. 81. – №5. – P.506–513.
141. Muzzarelli, A.A. Chitin in nature and technology / A.A. Muzzarelli, C. Jeuniaux, G.W. Gooday. – Plenum Press, New York, 1986. – 420 p.
142. Oqawa, K. X - ray diffraction study of sulfuric, nitric, halogen, and salts of chitosan / K. Oqawa, I. Ibuka // *Carbohydrate Research.* – 1987. – Vol. 160. – P.425–433.
143. Otterlei, M. Characterization of binding and TNF-alpha-inducing ability of chitosans on monocytes: the involvement of CD 14 / M. Otterlei, K.M. Varum, L. Ryan et al. // *Vaccine.* – 1994. – Vol. 12. – № 9. – P.825–832.
144. Pat. 5900408 USA, Int. Cl. A61K 31/73, A61K 9/22. Methods of creating a unique chitosan and employing the same to form complexes with drugs, delivery of the same within a patient and a related dosage form / Lawrence H. Block. Assignee Duquesne University of the Holy Ghost. – №08/802,311; Fil. Feb. 18, 1997; Date of Patent 04.05.1999.
145. Qurrat-ul-Ain. Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects / Qurrat-ul-Ain, Sadhna Sharma, G. K. Khuller et al. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2003. – Vol. 51. – P.931–938.
146. Ramadas, M. Lipoinulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats // M. Ramadas, W. Paul, KJ.Dillep et al. // *J. Microencapsul.* – 2000. – Vol. 17. – №4. – P.405–411.
147. Ramundo, J. Enzymatic Wound Debridement / J. Ramundo, Mikel Gray // *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing.* – 2008. – Vol.35. – №3. – P.273–280.
148. Sato, M. In vivo drug release and antitumor characteristics of water-soluble conjugates of mitomycin C with glycol-chitosan and N-succinyl-chitosan / M. Sato, H. Onishi, J. Takahara et al. // *Biol. Pharm. Bull.* – 1996. – Vol.19. – №9. – P.1170–1177.
149. Shibata, Y. Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice / Y. Shibata, L.A. Foster, W.J. Metzger et al. // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65. – № 5. – P.1734–1741.
150. Singh, M. Potential biosoluble carriers / M. Singh, A. R. Ray, P. Vasudevan et al. // *Biomaterials.* – 1979. – Vol. 7(4). – P.495–512.
151. Sosa, M.A. N-carboxymethylchitosan-N, O-sulfate as an anti-HIV-1 agent / M.A. Sosa, F. Fazely, J.A. Koch et al. // *Biochem. biophys. Res. Commun.* – 1991. – Vol. 174. – № 2. – P.489–496.
152. Soto-Peralta, N.V. Effects of treatments on the clarity and color of Apple Juice / Soto-N.V. Peralta, H. Mueller, D. Knorr // *J. of Food Science.* – 1989. – Vol. 54. – № 2. – P.495–496.
153. Tozaki, H. Chitosan Capsule for colon-specific drug delivery: Improvement of insulin absorption from the rat colon / H. Tozaki, J. Komoike, C. Tada et al. // *Journal of Pharmaceutical*

Sciences. – 1997. – Vol. 86. – №9. – P.1016–1021.

154. Tozaki, H. Mechanism of antimicrobial resistance chitin polymers / H. Tozaki, T. Fujita, A. Terahe et al. // J. Pharm. Pharmacol. – 1999. – Vol. 51. – N10. – P.1107–1112.

155. Yamamoto, A. Conformational behavior of chitosan in the acetate salt: A varies study / A. Yamamoto, I. Kawada, T. Yui et al. // Bioscience Biotechnology and Biochemistry. – 1997. – Vol. 61. – P.1230–1232.

156. Zatul, Iffah Mohd Arshad. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies / Zatul Iffah Mohd Arshad, Azura Amid, Faridah Yusof et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol.98. – P.7283–7297.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Патенты

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2687102

**Фармацевтическая субстанция для лечения
инфицированных ран различного генеза**

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

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018116181

Приоритет изобретения **28 апреля 2018 г.**

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **07 мая 2019 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **28 апреля 2038 г.**



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев

Авторы: **Пятигорская Наталья Валерьевна (RU), Бркич Галина
Эдуардовна (RU), Бркич Лилиана Любановна (RU), Медушева
Елена Олеговна (RU), Белов Алексей Алексеевич (RU), Кулагина
Алла Семеновна (RU), Береговых Валерий Васильевич (RU),
Свистунов Андрей Алексеевич (RU)**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 687 102**⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
A61K 31/722 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК
A61K 31/722 (2013.01); A61K 38/43 (2013.01); A61K 47/12 (2013.01); A61P 17/02 (2013.01)

(21) (22) Заявка: 2018116181, 28.04.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.04.2018

Дата регистрации:
07.05.2019

Приоритет(ы):
 (22) Дата подачи заявки: 28.04.2018

(45) Опубликовано: 07.05.2019 Бюл. № 13

Адрес для переписки:
 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2,
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
 Сеченова Минздрава России (Сеченовский
 Университет)

(72) Автор(ы):

Пятигорская Наталья Валерьевна (RU),
 Бркич Галина Эдуардовна (RU),
 Бркич Лилиана Любановна (RU),
 Медушева Елена Олеговна (RU),
 Белов Алексей Алексеевич (RU),
 Кулагина Алла Семеновна (RU),
 Береговых Валерий Васильевич (RU),
 Свистунов Андрей Алексеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2468129 C2, 27.11.2012. RU
 2397752 C2, 27.08.2010. RU 2639379 C1,
 21.12.2017.

(54) **Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза**

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения инфицированных ран различного генеза. Фармацевтическая композиция содержит химопсин, хитозан, уксусную кислоту и воду при следующем массовом соотношении, мас. %: химопсин - 0,2, хитозан - 1,0, уксусная

кислота - 0,6, вода очищенная - до 100,0. Изобретение обеспечивает комплексную протеолитическую, антимикробную и регенерирующую активность для местной терапии инфицированных ран различного генеза. 7 ил., 7 табл., 3 пр.

RU 2 687 102 C 1

RU 2 687 102 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2697869

**Фармацевтическая субстанция для лечения
инфицированных ран различного генеза**

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

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018116179

Приоритет изобретения **28 апреля 2018 г.**

Дата государственной регистрации в


Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **21 августа 2019 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **28 апреля 2038 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Изrael



Авторы: **Пятигорская Наталья Валерьевна (RU), Бркич Галина
Эдуардовна (RU), Бркич Лилиана Любановна (RU), Медушева
Елена Олеговна (RU), Белов Алексей Алексеевич (RU), Кулагина
Алла Семеновна (RU), Береговых Валерий Васильевич (RU),
Свиствунов Андрей Алексеевич (RU)**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 697 869** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01)
A61K 31/131 (2006.01)
A61K 31/722 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 47/18 (2019.05); *A61K 47/38* (2019.05); *A61K 31/131* (2019.05); *A61K 31/722* (2019.05); *A61P 31/00* (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018116179, 28.04.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.04.2018

Дата регистрации:
21.08.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.04.2018

(45) Опубликовано: 21.08.2019 Бюл. № 24

Адрес для переписки:

119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2,
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
 Сеченова Минздрава России (Сеченовский
 Университет)

(72) Автор(ы):

Пятигорская Наталья Валерьевна (RU),
 Брkich Галина Эдуардовна (RU),
 Брkich Лилиана Любановна (RU),
 Медушева Елена Олеговна (RU),
 Белов Алексей Алексеевич (RU),
 Кулагина Алла Семеновна (RU),
 Береговых Валерий Васильевич (RU),
 Свистунов Андрей Алексеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ПОГОРЕЛОВ М.В. и др.

Экспериментальное обоснование применения
 геля на основе ацетата хитозана для лечения
 ожогов // Российский медико-биологический
 вестник имени академика И.П. Павлова. - 2012.
 - No. 4. RU 2271814 C2, 20.03.2006. US 9439925
 B2, 13.09.2016. MI F.L. et al. Control of wound
 infections using a bilayer chitosan wound dressing
 with (см. прод.)

(54) Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтике, а
 именно к фармацевтической субстанции для
 получения лекарственного средства для лечения
 инфицированных ран. При этом субстанция
 характеризуется включением эффективного

количества активных компонентов мирамистина
 и хитозана, а также уксусной кислоты в качестве
 вспомогательного вещества и воды при
 следующем содержании ингредиентов, в % (масс.):
 Мирамистин - 0,05, Хитозан - 1,0, Уксусная

RU 2 697 869 C 1

RU 2 697 869 C 1

кислота - 0,6, Вода очищенная - до 100,0. Способ получения фармацевтической субстанции характеризуется тем, что хитозан смешивают с 0,5%-ным раствором уксусной кислоты, постоянно перемешивают и приливают воду до получения суспензии, перемешивают до полного растворения хитозана и оставляют стоять до получения гелеобразного раствора, затем иммобилизуют антимикробный препарат мирамистин на хитозан при комнатной температуре при массовом соотношении хитозан

и мирамистин 20:1 и получают путем лиофилизации при температуре -40°C субстанцию хитозан-мирамистин в форме рыхлой губчатой массы, причем вода удаляется из замороженной субстанции путем сублимации льда. Изобретение обеспечивает получение биологически активного соединения: комплекса хитозана с антимикробным препаратом мирамистином (КХМ), а также расширение арсенала ранозаживляющих и антимикробных средств. 1 з.п. ф-лы, 7 ил., 3 пр.

(56) (продолжение):

sustainable antibiotic delivery // *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* - 2002. - Т. 59. - No. 3. - С. 438-449.

R U 2 6 9 7 8 6 9 C 1

R U 2 6 9 7 8 6 9 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2691144

**Комбинированная композиция для лечения
инфицированных ран различного генеза**

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

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2018116176

Приоритет изобретения 28 апреля 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 11 июня 2019 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 28 апреля 2038 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев

Авторы: **Пятигорская Наталья Валерьевна (RU), Бркич Галина
Эдуардовна (RU), Бркич Лилиана Любановна (RU), Медушева
Елена Олеговна (RU), Белов Алексей Алексеевич (RU), Кулагина
Алла Семеновна (RU), Береговых Валерий Васильевич (RU),
Свистунов Андрей Алексеевич (RU), Сальникова Татьяна
Сергеевна (RU)**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 691 144**⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 31/722 (2006.01)
A61K 31/167 (2006.01)
A61K 31/14 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/46 (2019.02); A61K 31/722 (2019.02); A61K 31/167 (2019.02); A61K 31/14 (2019.02); A61K 47/38 (2019.02); A61P 31/00 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2018116176, 28.04.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.04.2018

Дата регистрации:
11.06.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.04.2018

(45) Опубликовано: 11.06.2019 Бюл. № 17

Адрес для переписки:

119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
Сеченова Минздрава России (Сеченовский
Университет)

(72) Автор(ы):

Пятигорская Наталья Валерьевна (RU),
Бркич Галина Эдуардовна (RU),
Бркич Лилиана Любановна (RU),
Медушева Елена Олеговна (RU),
Белов Алексей Алексеевич (RU),
Кулагина Алла Семеновна (RU),
Береговых Валерий Васильевич (RU),
Свистунов Андрей Алексеевич (RU),
Сальникова Татьяна Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2014113441 A, 27.10.2015. RU
2115418 C1, 20.07.1998. RU 2397752 C2,
27.08.2010. WO 2008094002 A1, 07.08.2008.

(54) Комбинированная композиция для лечения инфицированных ран различного генеза

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и представляет собой комбинированную фармацевтическую композицию антисептического действия для лечения инфицированных ран различного генеза. Отличается тем, что представляет собой фармацевтическую композицию в виде комбинации, где в качестве активных

фармацевтических агентов выступают хитозан, химопсин, мирамистин и лидокаина гидрохлорид. Изобретение обеспечивает повышение терапевтического эффекта за счет расширения спектра действия препарата, включающего комплексное воздействие на очаг повреждения, а также за счет пролонгированного лечебного действия препарата. 4 пр., 2 табл., 4 ил.

RU 2 691 144 C 1

RU 2 691 144 C 1

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Акт внедрения результатов научных достижений

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Генеральный директора
по инновационному развитию

ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»

_____ Я.Э.Безчинский

«18» декабря 2017г.

АКТ №35

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 препарата «Гель ранозаживляющий» по ОПР 71.05-2017. Данное предложение было разработано в ходе выполнения научно-исследовательской работы по теме: «Разработка состава и технологии получения комбинированного лекарственного препарата на основе хитозансодержащих фармацевтических субстанций» по опытно-промышленному регламенту в условиях и на производственной площадке ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»

Опытно-промышленный регламент на лекарственный препарат «Гель ранозаживляющий», может быть рекомендован к внедрению в производство ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» с использованием стандартного оборудования.

Главный инженер



Бирюков А.В

Заведующий КоАЛ



Демерлий А.М

Начальник отдела обеспечения качества
уполномоченное лицо



Ларионов Д.Ю.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Титульный лист опытно-промышленного регламента

ООО «ТУЛЬСКАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ФАБРИКА»

Для служебного пользования

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Тульская фармацевтическая
фабрика»

Л.Я. Рабинович



О П Ы Т Н О – П Р О М Ы Ш Л Е Н Ы Й Р Е Г Л А М Е Н Т

получения лекарственного препарата

ГЕЛЬ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ

ОПР 71.05-2017

Срок действия регламента до «18» декабря 2022 года

Москва 2017

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Акт внедрения результатов научных достижений

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Генерального директора
по инновационному развитию
ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»
Я.Э.Безчинский
« 23 » сентября 2017г.

АКТ №17

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 препарата «Гель ранозаживляющий».

Данное предложение было разработано в ходе выполнения научно-исследовательской работы по теме: «Разработка состава и технологии получения комбинированного лекарственного препарата на основе хитозансодержащих фармацевтических субстанций» в условиях контрольно-аналитической лаборатории ООО «Тульская фармацевтическая фабрика».

Данное внедрение может быть использовано для разработки проекта нормативной документации на лекарственный препарат «Гель ранозаживляющий» для дальнейшего производства на ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» с использованием стандартного оборудования.

Главный инженер

Бирюков А.В

Заведующий КоАЛ

Демерлий А.М

Начальник отдела обеспечения качества
уполномоченное лицо

Ларионов Д.Ю.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Проект нормативной документации

ПРОЕКТ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Номер реестровой записи № _____

Дата включения в государственный реестр лекарственных средств для медицинского применения «__» _____ 20__ г.

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

_____ (номер)

Гель ранозаживляющий

торговое наименование

_____ международное непатентованное или химическое наименование препарата

гель для местного применения

форма выпуска

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»

ФАСОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ УПАКОВКА)

ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»

СПЕЦИФИКАЦИЯ

ГЛФ «ГЕЛЬ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ» ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Показатель	Метод	Норма
Описание	Визуальный Органолептический ГФ РФ ОФС.1.1.0001.18	Гомогенный гель молочно-белого цвета, без запаха
Подлинность Химопсин	А. Протеолитическая активность, спектрофотометрический метод Б. Качественная реакция на химопсин	Должен обладать протеолитической активностью должен обладать способностью створаживать молоко за время не более 50 сек
Мирамистин	А. ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО мирамистина
Лидокаин	А. ВЭЖХ Б. Качественная реакция с кобальта хлоридом	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме СО лидокаина Появление ярко-зеленого окрашивания
Масса (объем) содержимого упаковки	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007.15	Среднее значение массы содержимого упаковки не должно быть менее 95,0% от указанной массы
рН	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004.15 Потенциометрический	от 5,1 до 5,3 (1,0 % водный раствор)
Вязкость	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0015.15	от 0,70 до 1,2 Па·с
Микробиологическая чистота	ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 2
Количественное определение: Химопсин		

	Протеолитическая активность - Спектрофотометрический	Не менее 2,0±0,5 ПЕ на 1 г химопсина
Мирамистин	ВЭЖХ	от 95 до 105% от заявленного количества
Лидокаин	ВЭЖХ	от 95 до 105% от заявленного количества
Упаковка	ГЛФ упаковывают в тубы 30,0 г (тубы AVL, диаметр тубы - 25 мм), с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой. Каждую тубу вместе с инструкцией по применению помещают в картонную пачку.	
Маркировка	На этикетке контейнера на русском языке указывают: наименование и логотип владельца РУ, наименование, адрес предприятия – производителя, торговое наименование лекарственного препарата, регистрационный номер, количество в упаковке в граммах, условия хранения, номер серии, срок годности.	
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С	
Срок годности	2 года	

ГЛФ «Гель ранозаживляющий» представляет собой комбинированное лекарственное средство действующим веществом которого являются протеолитический комплекс – химопсин, антимикробный препарат широкого спектра действия – мирамистин и анестетик – лидокаин.

Состав на 100 г геля:

Состав	НД	Содержание, г
<i>Действующие вещества</i>		
Комплекс хитозан-химопсин	проект НД	1,5 (содержание химопсина 0,2)
Комплекс хитозан-мирамистин	проект НД	1,4 (содержание мирамистина 0,05)
Лидокаина гидрохлорид	«Дж. Амфрейлабораториз» Индия РУ№ЛСР-008000/10 от 12.08.2010	0,1
<i>Вспомогательные вещества</i>		
ПАА	ООО НТФ «Атомбиотех» ТУ 9398-001-059669 19-2008	0,1

ГПМЦ	ID 34680, Coloreon Limited, England	2,0
Глицерин дистиллированный	ЗАО «Аист», Санкт-Петербург ГОСТ 6824-96	5,0
Вода очищенная		до 100

Описание. ГФ РФ ОФС.1.1.0001.18

Гомогенный гель молочно-белого цвета, без запаха.

Подлинность.

А. Химопсин. Спектрофотометрическим методом проводят определение протеолитической активности одновременно с количественным определением. ГЛФ «Гель ранозаживляющий» должен обладать протеолитической активностью.

Б. Качественная реакция на химопсин. Подлинность геля по химопсину определяют по створаживающему действию химопсина на раствор молока.

Реактивы. Кальция хлорид тетрагидрат; уксусная кислота ледяная; натрия ацетат безводный; вода.

Методика. Определение створаживающей активности проводят в водяном термостате с прозрачными стенками из стекла или плексигласа.

Около 2,0 г геля растворяют в 4 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора pH 5,6. В 3 пробирки вместимостью 20 мл вносят по 12 мл раствора молока и пробирки прогревают в течение 15 мин при $35,5 \pm 0,5$ °С. Затем в 2 пробирки прибавляют по 2,0 мл раствора испытуемого геля, взбалтывают и отмечают время по секундомеру. Наблюдение проводят в проходящем свете, не вынимая пробирок из термостата. Конец реакции отмечают по появлению первых крупинок казеина - створаживание. В контрольную пробу (3-я пробирка) к раствору молока прибавляют 2,0 мл 0,1М ацетатного буферного раствора pH 5,6 и выдерживают в термостате 60 мин по секундомеру. Молоко не должно створаживаться.

Створаживающая активность выражается временем, прошедшим с момента добавления геля до появления первых признаков створаживания молока. Время створаживания для ГЛФ должно быть не более 50 сек.

Примечание:

1. Приготовление раствора молока

Натуральное свежее коровье молоко центрифугируют 30 мин, удаляют жир и лиофильно высушивают. Хранят в стеклянной банке с притертой крышкой в темном, прохладном месте. Сухое молоко件годно к употреблению в течение 6 месяцев. 0,75 г сухого обезжиренного молока растирают в ступке с небольшим количеством воды. Растертую массу количественно переносят в цилиндр вместимостью 50 мл, добавляют 1 мл 3М раствора кальция хлорида и 5 мл 1 М

ацетатного буфера рН 5,6, доводят водой до 50 мл и перемешивают. Раствор молока готовят непосредственно перед проведением анализа.

2. Приготовление 1М ацетатного буфера рН 5,6

5,8 мл уксусной кислоты ледяной помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 13,6 г натрия ацетата безводного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, объем раствора доводят водой до метки и перемешивают. Смешивают полученные растворы в объемном соотношении 5,5:44,5. рН буферного раствора 5,6.

Мирамистин.

А. ВЭЖХ. Проводят одновременно с количественным определением.

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца мирамистина.

Б. Качественная реакция с калия хроматом.

К 1,00 мл 1% водного раствора геля прибавляют 0,05 мл хлористоводородной кислоты, концентрированной и 0,15 мл 5% раствора калия хромата; образуется аморфный осадок оранжевого цвета, нерастворимый в хлористоводородной кислоте, разведенной и растворимый в растворе аммиака.

Лидокаин.

А. ВЭЖХ. Проводят одновременно с количественным определением.

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного образца лидокаина.

Б. Качественная реакция с кобальта хлоридом.

К 10,0 г геля прибавляют 10-15 капель раствора 5% кобальта хлорида и встряхивают 2 мин. Появляется ярко-зеленое окрашивание.

Масса (объем) содержимого упаковки. ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007.15

Определение проводят на 10 упаковках по разности масс заполненной и пустой упаковки. Среднее значение массы содержимого упаковки не должно быть менее 95,0% от указанной массы.

рН. ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004.15, потенциметрически.

От 5,1 до 5,3 (0,1% водный раствор).

Вязкость динамическая. ГФ РФ ОФС.1.2.1.0015.15

От 0,70 до 1,2 Па·с.

Микробиологическая чистота. ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002.18

Категория 2. Допускается в 1 г геля содержание общего числа аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) – не более 10^2 КОЕ; Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* и отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г геля.

Количественное определение.

Химопсин. Определение протеолитической активности.

Метод основан на определении количества тирозина, освобождаемого химопсином из казеина. За единицу ПЕ принимают такое количество химопсина, которое за 1 мин при температуре 37 °С катализирует переход в неосаждаемое 10% трихлоруксусной кислотой состояние такое количество казеина, которое соответствует 1 мкМоль тирозина.

Реактивы. Казеин по Гаммерстону; натрия гидроксид; трихлоруксусная кислота; тирозин; калия фосфат однозамещенный; натрия фосфат двузамещенный.

Испытуемый раствор. Навеску образца 2,0 г помещают в мерную колбу объемом 20 мл, добавляют 10 мл воды дистиллированной, смесь перемешивают до полного растворения субстанции и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. На анализ берут 0,2 мл испытуемого раствора.

Раствор субстрата. В качестве субстрата используют 2% раствор казеина по Гаммерстону (ТУ 6-09-3574-74) в 0,1М растворе фосфатного буфера, рН 8,0. Перед анализом рН раствора казеина доводят до рН 8,0 раствором 30% натрия гидроксида. Раствор субстрата хранят в темноте при температуре 5-7 °С не более 10 дней.

Методика. Для определения берут три аналитические пробы испытуемого раствора объемом 0,2 мл – две опытные и одна – контрольная.

В три пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 мл приливают 1,8 мл 0,1М фосфатного буферного раствора с рН 8,0 и 2,0 мл 2 % раствора казеина по Гаммерстону в каждую. Пробирки закрывают пробками и помещают в водяной термостат при температуре $37 \pm 0,5$ °С. Через 10 мин в опытные пробирки быстро приливают испытуемый раствор. Реакцию останавливают через 25-30 минут (точное время отмечают по секундомеру) добавлением в опытные пробирки по 4 мл 10% раствора кислоты трихлоруксусной. Через 15 мин раствор центрифугируют при 20 °С в течение 20 минут при 14000 оборотах/мин, в фильтрате спектрофотометрически определяют оптическую плотность при длине волны 280 ± 2 нм в кювете толщиной 10 мм. В контрольную пробирку сначала добавляют 4 мл 10% раствора трихлоруксусной, а затем испытуемый раствор, далее аналогично опытному.

Спектрофотометр настраивают по раствору, состоящему из равных объемов 0,1М фосфатного буферного раствора и 10% раствора трихлоруксусной кислоты.

Протеолитическую активность ПЕ вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(A_1 - A_2) \times V \times V_1}{a \times K_T \times V_0 \times t} \text{ (ПЕ)}$$

A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора геля при 280 нм;

A_2 – оптическая плотность контрольного раствора при 280 нм;

V_1 – объем испытуемого раствора, мл;

V – объем реакционной смеси в пробирке, мл;

V_0 – объем аналитической пробы геля, мл;

a – навеска геля, в мг;

K_T – тирозиновый коэффициент – 1,20;

t – время реакции, мин;

Норма: Протеолитическая активность геля должна быть не менее $2,0 \pm 0,5$ ПЕ на 1 г химопсина.

Приготовление 0,1М фосфатного буферного раствора.

9,078 г (KH_2PO_4) калия фосфата однозамещенного растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора до метки. 23,881 г ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) натрия фосфата двузамещенного растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1000 мл и доводят объем буфера до метки. Смешиванием различных объемов растворов натрия фосфата двузамещенного и калия фосфата однозамещенного получают растворы с различным значением рН.

Na₂HPO₄, мл	KH₂PO₄, мл	рН	Na₂HPO₄, мл	KH₂PO₄, мл	рН
0,00	10,00	4,49	6,00	4,00	6,98
0,10	9,90	4,94	7,00	3,00	7,17
0,25	9,75	5,29	8,00	2,00	7,38
0,50	9,50	5,59	9,00	1,00	7,73
1,00	9,00	5,91	9,50	0,50	8,04
2,00	8,00	6,24	9,75	0,25	8,34
3,00	7,00	6,47	9,90	0,10	8,67
4,00	6,00	6,64	10,00	0,00	9,18
5,00	5,00	6,81			

Пример: Для получения 0,1М фосфатного буферного раствора с рН 8,0 – 936 мл раствора натрия фосфата двузамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объем буферного раствора до метки раствором калия фосфата однозамещенного. Измеряют рН (в случае отклонения от рН 8,0 доводят до требуемого значения одним из буферных растворов). Срок годности исходных растворов и буферного раствора 2 месяца при хранении в холодильнике.

Приготовление 2% раствора казеина по Гаммерстену. 2,0 г казеина по Гаммерстену (ТУ 6-09-3574-74) растворяют в 100 мл фосфатного буфера с рН 8,0 при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После растворения измеряют рН раствора и при необходимости доводят его до рН8,0 5М раствором натрия гидроксида. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление 10% раствора трихлоруксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл наливают 200–250 мл воды и прибавляют 100,0 г трихлоруксусной кислоты (ТУ 6-09-1926–77). После растворения кислоты объем раствора доводят водой до метки.

Раствор годен в течение 6 месяцев при хранении в темной бутылки и при температуре не выше 20 °С.

Приготовление раствора А. Около 36,2 мг тирозина помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в 100-150 мл раствора Б и доводят объем до метки тем же растворителем. 1 мл полученного раствора содержит 0,40 мкМоль тирозина.

Раствор годен 1 месяц при хранении в холодильнике без замораживания.

Приготовление раствора Б. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 50 мл фосфатного буферного раствора с рН=8,0 и доводят до метки 10% раствором трихлоруксусной кислоты. Раствор используют свежеприготовленным.

Построение калибровочного графика. В пробирки с притертыми пробками помещают растворы А и Б в соответствии с таблицей.

№ п/п	Объем раствора А, мл	Объем раствора Б, мл	Содержание тирозина, С, мкМоль/мл
1	1,0	9,0	0,04
2	2,0	8,0	0,08
3	3,0	7,0	0,12
4	4,0	6,0	0,16
5	5,0	5,0	0,20
6	5,0	4,0	0,24
7	7,0	3,0	0,28
8	8,0	2,0	0,32
9	9,0	1,0	0,36
10	Раствор А	-	0,40

Растворы перемешивают, выдерживают при комнатной температуре 10-15 мин и измеряют оптическую плотность (А) на спектрофотометре при длине волны (280±2) нм в кювете толщиной 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор Б.

Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс концентрацию тирозина (С), а на оси ординат соответствующую оптическую плотность (А).

Количественное определение мирамистина

Определение проводят методом ВЭЖХ

Приготовление подвижной фазы. А 1,36 г калия фосфата однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл воды, устанавливают рН 3,0 фосфорной кислотой концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр типа Миллипор (HNWP) с размером пор 0,45 мкм. Хранить в плотно закрытой стеклянной бутылке в течение 1 мес.

Б - метанол

Приготовление стандартного раствора мирамистина. Около 100 мг стандарта мирамистина помещают в мерную колбу на 100 мл, добавляют 10 мл воды, перемешивают и доводят объем раствора подвижной фазой А до метки. 0,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки подвижной фазой А. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление испытуемого раствора. Около 1 г анализируемого образца геля ранозаживляющего помещают в мерную колбу на 100 мл, добавляют 10 мл воды, перемешивают до растворения, доводят до метки подвижной фазой А и фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр типа Миллипор (HNWP) с размером пор 0,45 мкм. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора плацебо

Состав	НД	Содержание, в г
Комплекс хитозан-химопсин	проект НД	1,4 (содержание химопсина 0,2)
ПАА	ООО НТФ«Атомбиотех» ТУ 9398-001-059669 19-2008	0,1
ГПМЦ	ID 34680, Coloreon Limited, England	0,9
Глицерин дистиллированный	ЗАО «Аист», Санкт-Петербург ГОСТ 6824-96	5,0
Вода очищенная		до 100 г

Условия хроматографирования

Колонка

колонка из нержавеющей стали размером 150 мм x 4,6 мм, заполненная сорбентом C18 с размером частиц 5 мкм (типа Zorbax Eclipse XDB-C18 кат. № 993967-902, «Agilent», США или аналогичная);

Подвижная фаза

подвижная фаза (элюент) состоит из смеси подвижной фазы А и Б (А-фосфатный буфер, pH=3,0; Б- метанол):

Время, мин	Раствор А, %	Раствор Б, %
0	90	10
10	20	80
13	20	80
15	90	10

Перед началом определения хроматографическую колонку в течение нескольких часов промывают смесью подвижных фаз А: Б (90:10) со скоростью 0,8 мл/мин до формирования стабильной базовой линии.

Относительное время удерживания мирамистина около 7 мин.

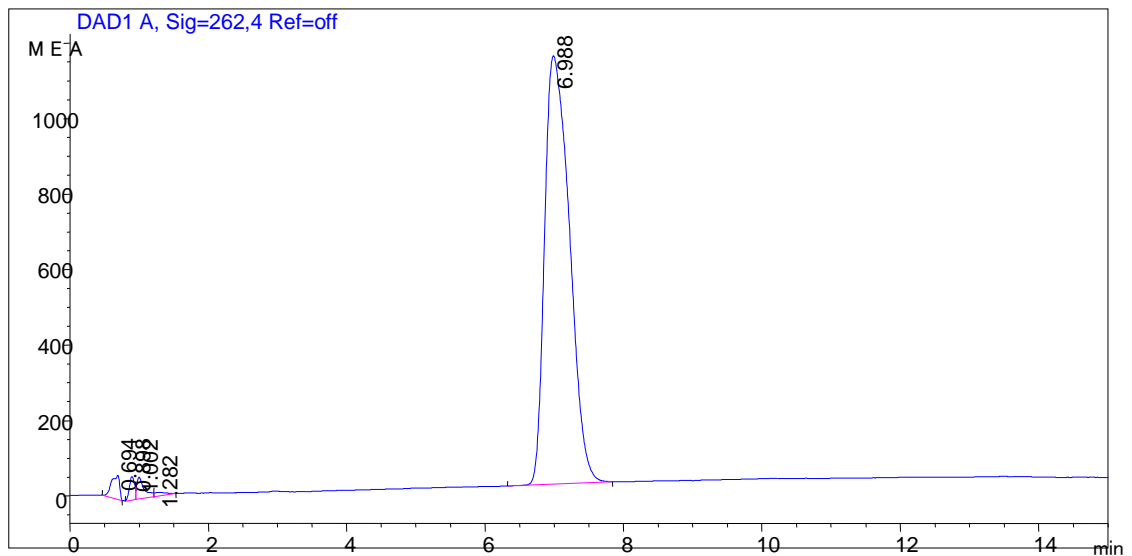


Рис. 1 СО мирамистина

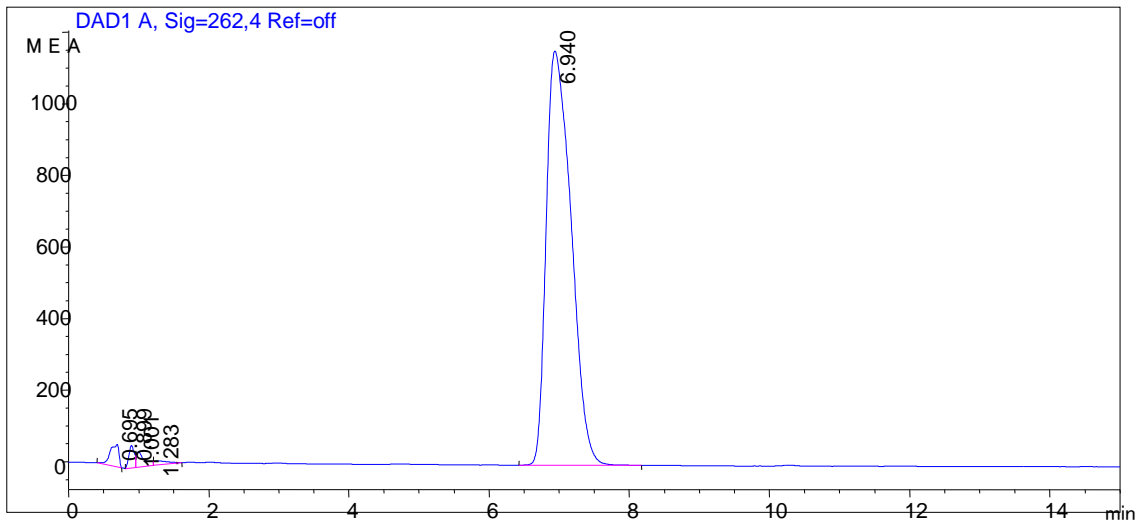


Рис. 2 Количественное определение мирамистина в геле.

Проверка пригодности хроматографической системы

Для проверки пригодности хроматографической системы хроматографируют стандартный раствор мирамистина, получая не менее 5 хроматограмм. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику мирамистина, должна быть не менее 2000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика мирамистина на повторных хроматограммах стандартного раствора, должно быть не более 2,0%;
- коэффициент асимметрии пика (T) мирамистина должен быть не более 2,5.

Далее хроматографируют последовательно равные объемы испытуемого и стандартного растворов, регистрируют хроматограммы.

Содержание мирамистина в геле ранозаживляющем (X), в % рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times a_0 \times 100 \times P}{S_0 \times 200 \times a_1 \times 0,05},$$

- где:
- S_1 – площадь пика мирамистина на хроматограмме испытуемого раствора;
 - S_0 – площадь пика мирамистина на хроматограмме стандартного раствора лидокаина;
 - a_1 – навеска геля, используемая для приготовления испытуемого раствора, в граммах;
 - a_0 – навеска СО мирамистина, в миллиграммах;
 - P – содержание активного вещества в СО мирамистина, в процентах;

Содержание мирамистина в геле ранозаживляющем: от 95 до 105% от заявленного количества.

Количественное определение лидокаина

Определение проводят методом ВЭЖХ

Приготовление подвижной фазы

А– 1,36 г калия фосфата однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл воды, устанавливают рН 3,0 фосфорной кислотой концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр типа Миллипор (HNWP) с размером пор 0,45 мкм.

Б – ацетонитрил

Хранить в плотно закрытой стеклянной бутылке в течение 1 мес.

Приготовление стандартного раствора лидокаина

Около 100 мг стандарта лидокаина гидрохлорида помещают в мерную колбу на 100 мл, добавляют 10 мл метанола, перемешивают и доводят объем раствора подвижной фазой А до метки. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки подвижной фазой А. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление испытуемого раствора. Около 1 г анализируемого образца геля ранозаживляющего помещают в мерную колбу на 100 мл, добавляют 10 мл воды, перемешивают до растворения, доводят до метки подвижной фазой А и фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр типа Миллипор (HNWP) с размером пор 0,45 мкм. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора плацебо

Состав	НД	Содержание, г
Комплекс хитозан-химопсин	проект НД	1,4 (содержание химопсина 0,2)
ПАА	ООО НТФ «Атомбиотех» ТУ 9398-001-059669 19-2008	0,1
ГПМЦ	ID 34680, Coloreon Limited, England	0,9
Глицерин дистиллированный	ЗАО «Аист», Санкт- Петербург ГОСТ 6824-96	5,0
Вода очищенная		до 100 г

Хроматографические условия

Колонка - Lorbaх Eclipse Plus C18

ПФ – фосфатный буфер (10 мМоль, рН 3,0) : ацетонитрил = 98:2

Скорость потока – 0,25 мл/мин

Температура колонки – 26 °С

Детектор – 210 нм

Объем вводимой пробы – 5 мкл

Время анализа – 30 мин

Хроматографируют раствор стандартного образца, получая не менее трех хроматограмм.

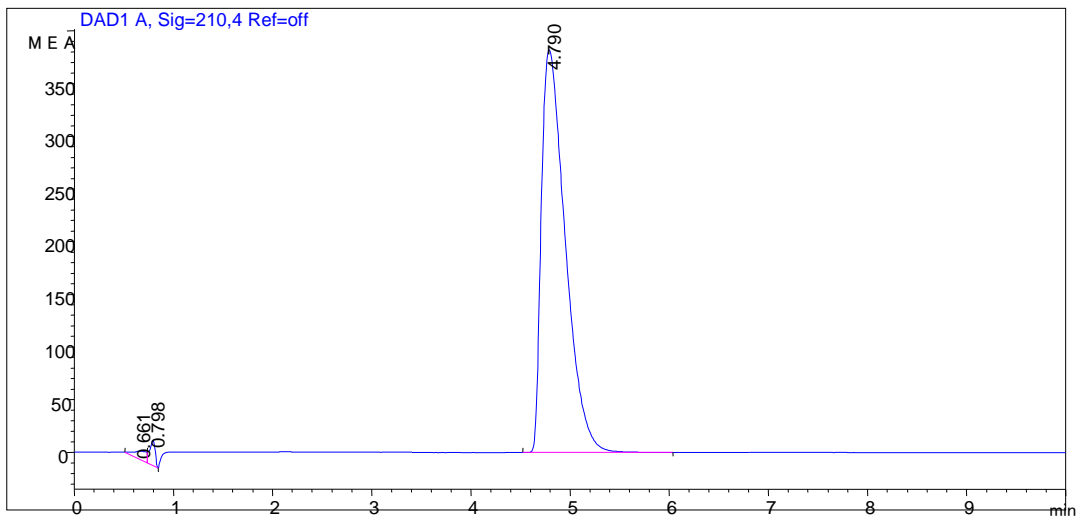


Рисунок 3 – СО лидокаина

Затем хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор стандартного образца, получая не менее трех хроматограмм.

Относительное время удерживания лидокаина около 5 мин.

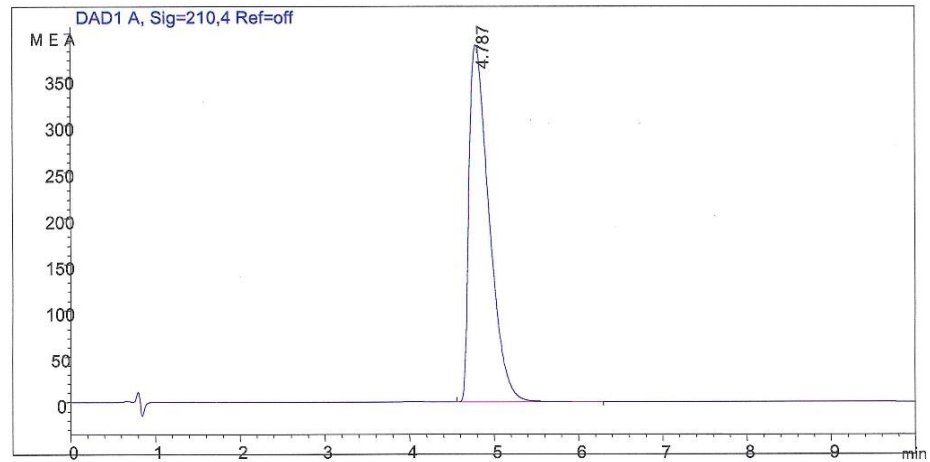


Рис.4 Количественное определение лидокаина гидрохлорида в геле.

Упаковка.

Гель ранозаживляющий упаковывают в тубы. Тубы вместимостью 10 г (тубы АВЛ, диаметр тубы - 14 мм) или 30,0 г (тубы АВЛ, диаметр тубы - 25 мм), с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой. Каждую тубу вместе с инструкцией по применению помещают в картонную пачку.

Маркировка.

На этикетке контейнера на русском языке указывают: наименование и логотип владельца РУ, наименование, адрес предприятия – производителя, торговое наименование лекарственного препарата, регистрационный номер, количество в упаковке в граммах, условия хранения, номер серии, срок годности.

Хранение.

В сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности.

2 года.

Примечание. Реактивы и титрованные растворы, приведенные в настоящей нормативной документации, описаны в соответствующих разделах ГФ РФ.

Генеральный директор
ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»

«30» сентября 2017 г.



Л.Я. Рабинович

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Выдержка из отчета о доклинических исследованиях лекарственного средства «Гель ранозаживляющий»

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

УТВЕРЖДАЮ
Первый проректор
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
член-корр. РАИ, д.м.н., профессор

А.А. Свистунов

«25» июня 2018 г.



ОТЧЕТ О ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

Этап третий

Государственный контракт от 30 сентября 2016 г. № 14.N08.11.0113
с дополнительным соглашением №1 от 21.08.2017 г.
в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской
Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу»

Ответственный исполнитель

А.А. Недорубов

Москва 2018

Выдержка из отчета о доклинических исследованиях лекарственного средства «Гель ранозаживляющий»:

Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства.

Величину доз для исследований, впервые проводимых у человека, необходимо определить путем подробного анализа предварительных доклинических фармакокинетических, фармакологических и токсикологических исследований.

Исследование новых фармакологических средств на животных основывается на данных о существовании определенной корреляции между влиянием этих соединений на животных и человека, физиологические и биохимические процессы которых во многом сходны. Изучение повреждающего действия исследуемого препарата на организм экспериментальных животных позволяет определить, какие органы и ткани наиболее чувствительны к данному веществу и на что следует обратить особое внимание при клинических испытаниях.

Специфическое действие лекарственного средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» для лечения инфицированных ран различного генеза было исследовано на модели плоской раны. Показано эффективное ранозаживляющее действие и высокий антибактериальный потенциал. При инфекции *S. Aureus* и *E. Coli* исследуемое лекарственное средство показывает лучший результат в заживлении ран, по сравнению с препаратом «Левомеколь».

Проведено исследование биоэквивалентности и фармакокинетики лекарственного средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров». Установлено, что исследуемое средство «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» при нанесении на плоскостную рану и при нанесении на неповрежденную кожу, не являются биоэквивалентными по действующему веществу – лидокаин. Относительная биодоступность по лидокаину лекарственного средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» при нанесении на плоскостную рану составила 167,9% относительно нанесения данного средства на неповрежденную кожу. Относительная биодоступность по активному мирамистину средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» при нанесении на плоскостную рану составила 119,8% относительно нанесения данного средства на неповрежденную кожу.

Экспериментальная фармакокинетика лидокаина и мирамистина после нанесения на неповрежденную кожу и на плоскостную рану ГЛФ «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» крысам носит линейный характер в диапазоне доз от 15 г/кг до 25 г/кг и нелинейный характер свыше 25 г/кг. Лидокаин и мирамистин после нанесения на

неповрежденную кожу и на плоскостную рану средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» крысам, не были детектированы в тканях и органах крыс.

В исследовании фармакокинетики лекарственного средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» при многократном введении лекарственного средства крысам в дозе 25 г/кг было показано, что шестикратное введение лекарственного средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» не влияет на основные фармакокинетические параметры препарата, кумуляции в организме не происходит.

При исследовании острой токсичности на крысах при накожном нанесении лекарственного средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» значения LD50 составили: крысам (самцы, самки) - LD50 > 50 г/кг; морские свинки (самцы, самки) - LD50 > 50 г/кг. При пероральном введении лекарственного средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» составили: крысам (самцы, самки) - LD50 > 75 г/кг; морские свинки (самцы, самки) - LD50 > 75 г/кг. В острых опытах крысам и морским свинкам (самцам и самкам) исследуемое лекарственное средство вводили накожно в дозах 15, 25 и 50 г/кг и перорально в дозах 25, 50 и 75 г/кг. Препарат сравнения «Левомеколь» вводили так же в максимальных дозах. Во всех дозах исследуемое лекарственное средство и препарат сравнения «Левомеколь» не вызывали ухудшение состояния животных. Спонтанная двигательная активность животных была аналогично контрольной группе. Гибель не отмечали на всех дозах у обоих видах животных. Так же не выявили отставания в приросте массы тела животных (морские свинки и крысы), получивших как исследуемое лекарственное средство, так и препарат сравнения «Левомеколь» от таковой у животных группы контроля. В ходе исследования не было зарегистрировано отклонений в гематологических и биохимических показателях во всех исследуемых группах по отношению к контролю. Таким образом, эксперименты на морских свинках и крысах свидетельствуют об отсутствии токсического влияния на кроветворение и биохимию исследуемого лекарственного средства и препарата сравнения «Левомеколь». При микроскопическом исследовании органов мышей и крыс в остром эксперименте во всех группах у животных в месте введения исследуемого лекарственного средства не наблюдалось отклонений от клинической нормы. Слизистая и внутренности сохраняли целостность. Анализ некропсии не выявил патологические изменений внутренних органов. Результаты исследований показали, что все вводимые дозы как исследуемого лекарственного средства, так и препарата сравнения «Левомеколь» не вызывают у животных побочные явления.

В результате исследования хронической токсичности было показано, что испытуемое лекарственное средство «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров», при накожном нанесении в течение 30 дней (с периодом отмены 14 дней) на крысах и кроликах

не оказывало хронического токсического действия. В ходе исследования хронической токсичности исследуемого лекарственного средства и препарата сравнения выявлено отсутствия влияния на динамику набора массы лабораторных животных по сравнению с контролем. Анализ полученных данных показал, что хроническое нанесение, как исследуемого лекарственного средства, так и препарата сравнения «Левомеколь», в дозе 15 г/кг не снижает двигательную и познавательную активности по сравнению с животными контрольной группы. Средние величины показателей горизонтальной и вертикальной двигательной активности (пересечения квадратов поля, стойки на задних лапах у крыс) и показатели познавательной активности (количество заглядываний в отверстия у крыс) через 14 дней введения средства у животных не отличаются от таковой контрольной группы. Данные анализа мочи 5 животных при дозе 15 г/кг свидетельствуют об отсутствии патологических изменений почек после 30 дней нанесения средств. В моче животных опытной группы и группы сравнения не обнаруживаются эритроциты и белок, что указывает на целостность фильтрационного аппарата почечных нефронов. Анализ представленных данных не выявил токсического эффекта исследуемого лекарственного средства и препарата сравнения на систему крови крыс и кроликов в хроническом эксперименте. Колебания всех величин находилось в пределах физиологической нормы. Биохимическое исследование сыворотки крови крыс и кроликов опытных групп не выявило статистически значимого изменения активности ферментов по сравнению с контрольной группой. Все значения биохимических параметров колебались в пределах физиологической нормы для данных видов животных. Оценка уровня и характер патологических изменений внутренних органов (систем внутренних органов) экспериментальных животных (крысы, кролики) не выявил патологических изменений. Гистологический анализ места введения и прилежащих тканей исследуемого лекарственного средства не выявил патологических изменений. Толщина эпидермиса соответствовала норме; увеличения площади кератиноцитов шиповатого слоя и ширины зернистого слоя не обнаружено, роговой слой соответствовал норме, возрастания в ростковом слое клеток отсутствовало. Лимфогистиоцитарной инфильтрации и полнокровии в дерме не обнаружено. Таким образом, лекарственное средство с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза при многократном введении не влияет на функции внутренних органов и жизненно важных систем организма: печени, почек, гемопозитической системы; не оказывает эффекта отсроченных реакций организм и побочных токсических эффектов, которые могут возникнуть при клиническом применении высоких доз средства.

Комплексное исследование мутагенных свойств лекарственного средства с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза показало отсутствие у исследуемого средства

мутагенных свойств. Лекарственное средство не индуцирует доминантные летальные мутации в зрелых, поздних и ранних сперматозоидах мышей F1 (СВАхС57BL6). Мутагенный эффект, в виде повышенной эмбриональной смертности, не был выявлен.

При изучении иммунотоксических свойств установлено, что лекарственное средство с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза не изменяет гуморальный иммунный ответ в дозе 1 ТД и 10 ТД, как и препарат сравнения Левомеколь не существенно влияли на число антителообразующих клеток в селезенке мышей как линии СВА, так и линии С57BL/6. Оба средства не оказали достоверного влияния на реакцию гиперчувствительности замедленного типа. При оценке влияния исследуемого лекарственного средства на фагоцитарный индекс перитонеальных макрофагов, обнаружено, что его введение не влияет на значение фагоцитарного индекса. Полученные данные показали, что исследуемое лекарственное средство и препарат сравнения, не изменяют достоверно микробицидности макрофагов, но влияют позитивно на кислородзависимую (НСТ-тест) и кислороднезависимую (ЛКТ-тест) микробицидность макрофагов. Таким образом, можно заключить, что лекарственное средство с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза не оказывает иммунотоксического действия, не ухудшает пролиферативную активность клеток-продуцентов антител, фагоцитоза, активации макрофагов - основных компонентов активного иммунного ответа. Таким образом, изучение иммунологической безопасности исследуемого лекарственного средства и препарата сравнения Левомеколь позволяет утверждать, что в отношении иммунологической безопасности исследуемое лекарственное средство является безопасным в диапазоне испытанных доз.

В результате изучения аллергенного действия лекарственного средства с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза конъюнктивальные пробы у морских свинок, реакция дегрануляции тучных клеток крыс были отрицательными, как и у препарата сравнения. При оценке степени влияния исследуемого лекарственного средства и препарата сравнения на клеточный иммунитет у мышей установлено, что лекарственные средства не оказывают выраженного влияния на реакцию миграции макрофагов, следовательно, на клеточное звено иммунитета. Испытание на псевдоаллергические реакции (тест Шор) показало, что исследуемое лекарственное средство не обладает гистаминолибераторным действием. Следовательно, комплексное исследование в тестах *in vivo* и *in vitro* аллергенного действия лекарственного средства с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и

акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза показало отсутствие у испытуемого средства сенсibiliзирующих свойств в диапазоне испытанных доз.

Исследовано влияние лекарственного средства на репродуктивную функцию самок и самцов крыс. Исследование репродуктивных органов беременных самок и половозрелых самцов, гистологическое изучение яичников и семенников, изучение функционального состояния сперматозоидов и индекса сперматогенеза, а также наблюдение за развитием потомства показало, что накожное нанесение исследуемого лекарственного средства (самкам – в течение 15 дней до спаривания, самцам – в течение 48 до спаривания) в суточных дозах 2,5, 10 и 25 г/кг не оказывает отрицательного действия на репродуктивную функцию самок и самцов крыс. Показано, что накожное нанесение исследуемого лекарственного средства беременным самкам крыс в первые 19 дней беременности в суточных дозах 2,5, 10 и 25 г/кг не оказывает эмбриотоксического, фетотоксического и тератогенного воздействия, регистрируемого в пренатальный период развития. Показано, что накожное нанесение исследуемого лекарственного средства беременным самкам крыс с 6-го дня беременности до родов в суточных дозах 2,5, 10 и 25 г/кг не оказывает отрицательного воздействия на постнатальное развитие потомства. Таким образом, проведенные исследования на крысах показали, что исследуемое лекарственное средство при многократном накожном нанесении не обладает репродуктивной токсичностью: оно не влияет на репродуктивную (генеративную) функцию самок и самцов и не оказывает эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном и постнатальном периодах развития.

Исследование механизма действия лекарственного средства с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров показало, что в тестах *in vivo* на модели плоской гнойной раны мирамистин активен в отношении различных патогенных микроорганизмов. Уже на третий день обсемененность раны в исследуемых группах существенно отставала от группы контроля.

В тестах *in vitro* мирамистин обладает выраженным биоцидным действием как против грамположительных, так грамотрицательных бактерий, а также грибов – возбудителей инфекций. Хитозан способствует более быстрому заживлению ран по сравнению с контролем. В тестах *in vitro* хитозан способствует пролонгированному действию химопсина и стабилизирует это за счет образования комплекса с образованием нековалентных связей. Химопсин эффективно проявляет свою протеолитическую активность в условиях аналогичных раневой поверхности. Результаты исследования кинетики инактивации нативного фермента (инаktivация проводилась в условиях отсутствия автолиза) и системы фермент-хитозан при различных температурах показывают, что хитозан способен стабилизировать фермент, о чем свидетельствуют полученные значения эффективных констант скорости инаktivации систем (Θ в зависимости от температуры

от 1.2 до 2.0). Это может происходить в основном за счет многоточечного связывания молекулы белка с молекулой полисахарида, которое не затрагивает активный центр фермента. Лидокаин в концентрации, используемой в исследуемом лекарственном средстве, оказывает выраженное антиноцицептивное действие в тестах горячая пластина и Tail Flick.

В результате проделанных работ оценена эффективность и безопасность лекарственного средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров». Результаты по изучению острой токсичности показывают, что при накожном нанесении лекарственного средства полуметальная доза для крыс (самцы, самки) составляет более 50 г/кг; для морских свинок – более 50 г/кг. При пероральном введении лекарственного средства полуметальная доза для крыс (самцы, самки) составляет более 75 г/кг; для морских свинок – более 75 г/кг. Что позволяет отнести данное лекарственное средство к 5 классу опасности (по Проекту классификации химических веществ OECD по показателям острой токсичности). Лекарственное средство не влияет на поведенческие реакции, на параметры кроветворения и на биохимические показатели, о чем свидетельствуют результаты, полученные в ходе изучения острой и хронической токсичностей. Гистологический анализ демонстрирует отсутствие паталогических изменений. Также, установлено, что данное лекарственное средства не обладает мутагенным эффектом, аллергенным действием. При изучении иммунотоксических свойств выявлено, что лекарственное средство является безопасным в диапазоне испытанных доз (1ТД и 10ТД). Лекарственное средство не влияет на репродуктивную (генеративную) функцию самок и самцов и не оказывает эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном и постнатальном периодах развития. Экспериментальная фармакокинетика лекарственного средства «Гель на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров» носит линейный характер у крыс в диапазоне доз от 15 г/кг до 25 г/кг и нелинейный характер свыше 25 г/кг.

Выполненные исследования позволили сформировать итоговый отчет о доклинических исследованиях лекарственного средства. В отчет вошли результаты проведенных исследований по изучению безопасности (острая, хроническая и специфическая токсичность) и клинической эффективности (специфическая фармакологическая активность, механизм действия), фармакокинетики.

Изучение механизма действия ГЛФ Гель для наружного применения

Исследования проводили в Центре доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Лекарственное средство с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза представляет собой полупрозрачный гель, на ГПМЦ и ПАА, с включением в качестве

фармацевтических субстанций комплекса хитозан–химопсин и комплекса хитозан–мирамистин, а в качестве анестетика лидокаина гидрохлорида. Лекарственное средство для лечения инфицированных ран обладает четырьмя видами фармакологических эффектов – некролитическим, антимикробным, ранозаживляющим и обезболивающим. Некролитическое действие обеспечивается химопсином, оказывающим лизирующий эффект на гнойные субстраты и очищающим раневую поверхность от гнойно-некротических масс. Компоненты химопсина расщепляют различные пептидные связи в белковой молекуле: трипсин гидролизует пептидные связи, содержащие остатки аргинина и лизина; химотрипсин расщепляет пептидные связи с остатками ароматических аминокислот - тирозина и триптофана. Химопсин восстанавливает микроциркуляцию в стенках раны, улучшает обменные процессы, что клинически проявляется уменьшением местного воспаления. Кроме того, имеется общее ранозаживляющее действие, в том числе обусловленное наличием хитозана в фармацевтических субстанциях. Химопсин гидролизует белки с образованием низкомолекулярных пептидов и расщеплением связей ароматических аминокислот (фенилаланин, триптофан, тирозин, метионин). При нанесении на ткани Химопсин расщепляет фибриновые образования и некротизированные тканевые структуры, сгустки крови. Также, разжижает экссудат и вязкий секрет.

Хитозан является носителем ферментного комплекса, обеспечивает пролонгированное терапевтическое действие фермента, оказывает ранозаживляющее действие. Использование комплекса хитозан-химопсин обеспечивает ферментативное очищение раны от гнойно-некротических масс за счет лизиса денатурированных белков.

Антимикробное действие обеспечивается наличием антисептика нового поколения мирамистина. Мирамистин – бензилдиметил [3-(миристоиламино) пропил] аммоний хлорид моногидрат. Соединение обладает выраженным бактерицидным действием в отношении аэробных и анаэробных бактерий, грамположительных (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracoides*) и грамотрицательных организмов (*Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella*), как в виде монокультур, так и в виде ассоциаций (синегнойная палочка и стафилококк, эшерихии и стафилококки), включая госпитальные штаммы, обладающие полирезистентностью к антибиотикам, воздействуя на наружную оболочку микробной клетки, что приводит к её разрушению и гибели. Мирамистин обеспечивает антимикробное и фунгицидное действие, усиливает функциональную активность иммунных клеток, при стимуляции местного (неспецифического) иммунитета, ускоряет процесс заживления ран, обеспечивает снижение резистентности патогенных микроорганизмов к антибактериальной терапии, а также активацию защитных реакций в месте применения за счет активации поглотительной и переваривающей функции фагоцитов. Не повреждает грануляции и

жизнеспособные клетки кожи, не угнетает краевую эпителизацию, не обладает местно-раздражающим действием.

Обезболивающий эффект осуществляется благодаря наличию анестетика лидокаина в составе лекарственного препарата. Лидокаин - лекарственное средство, обладающее местно-анестезирующим действием, блокирует потенциалзависимые натриевые каналы, что препятствует генерации импульсов в окончаниях чувствительных нервов и проведению импульсов по нервным волокнам. Подавляет проведение не только болевых импульсов, но и импульсов других модальностей. Анестезирующее действие лидокаина в 2-6 раз сильнее, чем новокаина и прокаина. При местном применении расширяет сосуды, не оказывает местно-раздражающего действия. Эффект развивается через 1-5 мин после нанесения на слизистые оболочки или кожу и сохраняется 30-60 мин (аэрозоль для местного применения - 10-15 мин, гель для наружного применения - 15-20 мин). Гелевая форма препарата обладает косвенным обезболивающим эффектом благодаря охлаждающему эффекту при апплицировании на поврежденную поверхность.

Изучение механизма действия мирамистина *in vitro* в составе ГЛФ

В эксперименте использовали бактериальные штаммы Американской коллекции типовых культур (АТСС), полученные из ВКМ г. Москва. Видовой состав представлен следующими микроорганизмами: *Escherichia coli* (АТСС 25922); *Staphylococcus aureus* (АТСС 6538-Р).

Бактерии культивируют на L-бульоне при температуре 37 °С в течение 20 часов. Затем с помощью методов количественного учета микроорганизмов (метода Коха), определяли количество клеток в 1 мл исходной суспензии. Для дальнейшего исследования использовали разведения, дающие обсемененность среды на чашке Петри 10^4 и 10^6 КОЕ/мл, что соответствует обсемененности раны при начальном и конечном этапах заболевания.

Из полученных разведений, предварительно тщательно перемешанных, проводили высев на поверхность агаровой пластинки в чашки Петри стерильной пипеткой в количестве 0,1 мл. Объем внесенной суспензии распределяли по поверхности среды стерильным шпателем.

Помимо поверхностного роста на агаровой пластинке применяли метод роста микроорганизмов в толще агарового слоя. Для осуществления данного метода подготавливали колбы с расплавленным L-агаром с температурой не выше 40 °С (предварительно автоклавированный), в которые вносили инокулят заданной концентрации. Далее содержимое колб разливали по чашкам Петри по 25 – 30 мл.

Изучение механизма действия мирамистина *in vivo* в составе ГЛФ

Для исследования противомикробного действия оптимальной моделью являлась инфицированная рана с использованием экспериментальных животных (крысы-самцы линии Wistar).

Дизайн исследования, наблюдения и измерения. Животным под наркозом в стерильных условиях моделировали гнойную рану по методике П.И. Толстых. Для этого на выбритом от шерсти участке спины, обработанном антисептиком, иссекали кожу с подкожной клетчаткой диаметром 25 мм. Мышечное дно раны раздавливали зажимом Кохера. В полученную рану вводили марлевый шарик, содержащий $1,2 \times 10^9$ микробных тел суточной культуры *S. Aureus* или $2,6 \times 10^9$ *E. Coli*, и рану ушивали. На следующие сутки (через 24 ч) после моделирования у всех животных формировался абсцесс со всеми характерными признаками воспаления. После снятия швов верхний лоскут кожи снимали, марлевый тампон удаляли, эвакуировали гной.

Площадь исходной раны определяли путем нанесения контура на прозрачную пленку и затем выполняли обработку раны исследуемым лекарственным средством. Для изучения механизма действия лекарственное средство наносили через 24 часа после моделирования гнойной раны. Лекарственное средство наносили в течение 15 дней. В эксперименте на животных изучалось влияние 0,05% раствора мирамистина на заживление гнойной *S. Aureus* и *E. Coli* раны. Контролем служили животные, раны которых обрабатывали 0,85% изотоническим раствором хлорида натрия. Распределение животных в экспериментальном изучении механизма действия мирамистина *in vivo*, представлено в таблице 10.

Таблица 10 - Распределение животных в экспериментальном изучении механизма действия

№	Тип раны	Препарат	Количество животных	Объем вмешательств
1.	<i>S. Aureus</i>	ГЛФ	18 ♂	Материалы для исследования забирали у крыс, после формирования гнойной раны на 1-е, 3-и, 5-е, 8-е, 10-е, 15-е сутки.
2.	<i>E. Coli</i>	ГЛФ	18 ♂	
3.	<i>S. Aureus</i>	Без лечения	18 ♂	
4.	<i>E. Coli</i>	Без лечения	18 ♂	

Наблюдение проводили за общим состоянием животных и за характером изменений со стороны раны в процессе развития гнойного очага и его лечения.

Во время стандартного бактериологического исследования определяли микробную обсемененность раны (КОЕ/1г ткани) путем посева инфильтрата раны в чашки Петри с плотной питательной средой (агар).

Инфицированная модельная рана являлась оптимальной *in vivo* иллюстрацией антимикробного эффекта лекарственного средства по нескольким параметрам:

- сроки очищения раневой поверхности от детрита;
- сроки полного заживления раны (эпителизация, рубцевание);
- данные планиметрических исследований (площадь раны);
- изменение микробной обсемененности;

- данные цитологических исследований;
- данные гистологических исследований.

Обработка данных. Достоверность различий для сравниваемых концентраций исследуемых соединений оценивали с помощью критерия Стьюдента (программа «Statistica 10.0»).

Морфологические исследования. Исследование проводили после выведения из опыта животных на 3, 5, 8, 10 и 15 сутки; при этом полоски ткани вырезали от края до середины раны и подлежащих мышц. Материал фиксировали в жидкости Корнуа в течение 2 часов и заливали в парафин. Срезы толщиной 5-7 микрон окрашивали гематоксилином-эозином, микрофуксином по Ван-Гизону на коллагеновые волокна, фукселином на эластические волокна, импрегнировали серебром по Гомори для выявления аргирофильных структур. Использовали также гистохимические методы: окраску толуидиновым синим, выявление гликозаминогликанов и их комплексов с белками (протеогликанов), ПАС-реакцию для выявления гликогена и гликопротеинов, реакцию Браше для выявления РНК и реакцию Фельгена для выявления ДНК в клетках.

Цитологическое исследование. Для изучения динамики раневого процесса использовали цитологическое изучение мазков-отпечатков с поверхности гнойных ран у животных до лечения, а также на 3, 8 и 10 сутки после начала терапии. С помощью стерильного тампона делали отпечатки на обезжиренном предметном стекле. Аналогичным образом материал забирали у животных группы сравнения. Мазки высушивали, фиксировали в метиловом спирте, окрашивали азур-эозином по методу Романовского-Гимза и реакцией Браше на РНК. Цитологическую картину изучали с использованием иммерсионной системы светового микроскопа. Клинические статистические показатели вычисляли по методу Стьюдента. Для выявления зёрен гликогена в клетках использовали PAS-реакцию. Кроме того, полуколичественно по 5 бальной шкале учитывали наличие в мазках микрофлоры, элементов некротического детрита, фибрина и незавершённого фагоцитоза микробов клетками.

Изучение механизма действия лидокаина in vivo в составе ГЛФ

Исследования проводили в Центре доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Исследование механизма действия лидокаина проводили на тесте горячей пластины. Крыс разделяют на 5 групп (Таблица 11).

Таблица 11 – Группы животных в исследовании механизма действия лидокаина in vivo

Группа	Доза	Временные точки
ГЛФ	0,2 мл 0,1% лидокаин	1, 2, 4 и 5 часов
Контроль	-	

Тест – Горячая пластина. Опытным животным на кожу лап наносили гель с 0,1% лидокаином. Препарат оставляли на воздухе в течение 1 минуты перед тем, как вернуть животных в свои клетки. Временные точки для регистрации реакции животных на стимулы 1, 2, 4 и 5 часов. Горячую пластину нагревали до (55 ± 2) °С, температуру контролировали и сохраняли постоянными на протяжении всего эксперимента. В каждый момент времени животных помещали на пластину. Облизывание, почесывание передних и задних лап или прыжки записывали в качестве диагностического критерия. Максимальный латентный период в 15 секунд был предварительно выбран во избежание постоянного повреждения.

Тест - Отдергивание хвоста. Опытным животным наносили гель с 0,1% лидокаином на кончик хвоста животных (на 5 см от основания и выше) и оставляли на воздухе сушить в течение 1 мин. Временные точки для исследования 1, 2, 4 и 5 часов. Хвост крыс погружали в горячую воду при постоянной температуре (55 ± 2) °С. Фиксировали латентность отвода хвоста от источника от горячей воды (Le Bars, Gozariu и Cadden 2001).

Статистический анализ. Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (SEM). Статистическая обработка данных велась с использованием программы Statistics for Windows 10,0. Различия считались достоверными при 95% уровне значимости ($P\leq 0.05$)

Изучение механизма действия хитозана в составе ГЛФ

Исследования проводили в Центре доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Для исследования механизма действия хитозана в составе ГЛФ был проведен комплекс исследований по изучению термоинактивации протеиназ в растворе, модифицированных хитозаном, при pH 6.2 (модель гнойной раны в начальный момент заживления), кинетики выхода протеиназ из геля, а также исследован ранозаживляющий потенциал хитозана. Для этого животным под наркозом в стерильных условиях моделировали плоскую рану по методике П.И. Толстых. Для этого на выбритом от шерсти участке спины, обработанном антисептиком, иссекали кожу с подкожной клетчаткой диаметром 25 мм. Площадь исходной раны определяли путем нанесения контура на прозрачную пленку и затем выполняли обработку раны гелем с 2% хитозаном. Для изучения ранозаживляющей способности хитозан наносили через 24 часа после моделирования раны. Хитозан наносили в течение 18 дней. В процессе лечения раз в три дня измеряли диаметр раны.

Анализ комплекса хитозан-химопсин

Для изучения действия температуры после полного растворения фермента в растворе заданного состава и требуемой концентрации небольшое количество полученного раствора наливают в стеклянные пробирки с притертыми пробками и помещают в водяной термостат при

заданной температуре (T , °C). Через определенное время (τ) пробирки быстро охлаждают до комнатной температуры и в них определяют остаточную биологическую активность (A_t). За 100% принимают значение активности до термоинактивации (A_0).

Изучение механизма действия химопсина *in vitro* в составе ГЛФ

Метод основан на способности химопсина створаживать молоко. Определение створаживающей активности проводят в водяном термостате с прозрачными стенками из стекла или плексигласа.

Приготовление раствора молока: Натуральное свежее коровье молоко центрифугируют 30 мин, удаляют жир и лиофильно высушивают. Хранят в стеклянной банке с притертой крышкой в темном, прохладном месте. 0,75 г сухого обезжиренного молока растирают в ступке с небольшим количеством воды. Растертую массу количественно переносят в цилиндр вместимостью 50 мл, добавляют 1 мл 3 М раствора кальция хлорида и 5 мл 1 М ацетатного буфера (рН 5,6), доводят водой до 50 мл и перемешивают. Раствор молока готовят непосредственно перед проведением анализа.

Материалы: 5,8 мл уксусной кислоты ледяной помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 13,6 г натрия ацетата безводного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, объем раствора доводят водой до метки и перемешивают. Смешивают полученные растворы в объемном соотношении 5, 5:44,5. рН буферной смеси 5,6.

Около 12 мг препарата растворяют в 4 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора рН 5,6. В 3 пробирки вместимостью 10 мл вносят по 3 мл раствора молока и пробирки прогревают в течение 15 мин при $(35,5 \pm 0,5)$ °C. Затем в 2 пробирки (последовательно) добавляют по 0,5 мл раствора испытуемой субстанции, взбалтывают и отмечают время по секундомеру. Наблюдение проводят в проходящем свете, не вынимая пробирок из термостата. Конец реакции отмечают по появлению первых признаков створаживания.

В контрольную пробу (3-я пробирка) к раствору молока добавляют 0,5 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора (рН 5,6). И выдерживают в термостате 60 мин по секундомеру. Молоко не должно свертываться. В группах химопсин-хитозан и химопсин образцы берут эквивалентное количество по химопсину.

Створаживающая активность выражается временем, прошедшим с момента добавления субстанции до появления первых признаков створаживания молока.

Определение протеолитической активности химопсина:

Методика устанавливает определение протеолитической активности белка в комбинированных лекарственных препаратах с иммобилизованными ферментами и ферментными комплексами, такими как химопсин, химотрипсин, трипсин коллагеназа, эластаза,

проназа и другими протеазами. Данная методика является модификацией метода Kunitz M. et. al. Метод основан на гидролизе казеина по Гаммерстону исследуемым ферментным препаратом до пептидов и аминокислот с последующим их определением.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

ООО «ТУЛЬСКАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ФАБРИКА»

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Тулская фармацевтическая
фабрика» Д.Я. Рабинович
«10» июля 2018 г.



**ПРОЕКТ ИНСТРУКЦИИ ПО МЕДИЦИНСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА**

Москва 2018

ПРОЕКТ ИНСТРУКЦИИ

по медицинскому применению препарата

«Гель ранозаживляющий»

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР _____**ТОРГОВОЕ НАЗВАНИЕ**

Гель ранозаживляющий

ГРУППИРОВОЧНОЕ НАЗВАНИЕ

Химотрипсин + Трипсин + Бензилдиметил [3-(миристоиламино) пропил]аммоний хлорид моногидрат + Лидокаин

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА

Гель для наружного применения.

СОСТАВ	Масса на 100 г
Химопсин	0,20
Мирамистин	0,05
Хитозан	2,00
Лидокаин	0,10
Полиакриламид	0,10
Гидроксипропилметилцеллюлоза	2,00
Глицерин	5,00
Вода очищенная	до 100,0

ОПИСАНИЕ

Однородная гелеобразная масса со слабым молочно-белым или желтоватым оттенком, без запаха.

ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ГРУППА

Антисептики и дезинфицирующие средства

Местный анестетики

Ферменты и антиферментные препараты

КОД АТХ

D06C

ФАРМАКОДИНАМИКА

Показано эффективное ранозаживляющее действие и выраженное бактериостатическое действие в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Гелевая основа препарата обеспечивает полную растворимость действующих веществ, имеет сорбционные

свойства, поглощая раневой экссудат. Гелевая основа образует на пораженной поверхности защитную пленку, которая пропускает воздух, предотвращает попадание инфекции и создает эффект барьера. Мирамистин и лидокаин не проникают через неповрежденную кожу и слизистые оболочки, поэтому не оказывают системного действия.

ФАРМАКОКИНЕТИКА

Фармакокинетика лидокаина и мирамистина после нанесения на кожу носит линейный характер в диапазоне терапевтических доз.

При многократном введении не происходит влияния на основные фармакокинетические параметры препарата, кумуляции в организме не происходит.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

Комбинированный препарат для наружного применения, обладает некролитическим, антимикробным, ранозаживляющим и обезболивающим эффектами.

ПОКАЗАНИЕ К ПРИМЕНЕНИЮ

Гнойные раны (в том числе инфицированные смешанной микрофлорой) в первой (гнойно-некротической) фазе раневого процесса.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Повышенная чувствительность к действующим веществам препарата.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ И В ПЕРИОД ЛАКТАЦИИ

В настоящее время данные отсутствуют.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОЗЫ

Местно, доза и кратность приема будут установлены после проведения клинических исследований.

ПОБОЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ

В настоящее время данные отсутствуют.

ПЕРЕДОЗИРОВКА

В настоящее время данные отсутствуют.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДРУГИМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ

В настоящее время данные отсутствуют.

ВЛИЯНИЕ НА СПОСОБНОСТЬ К ВОЖДЕНИЮ АВТОТРАНСПОРТА И УПРАВЛЕНИЮ ДРУГИМИ МЕХАНИЗМАМИ:

В настоящее время данные отсутствуют.

ФОРМА ВЫПУСКА

«Гель ранозаживляющий» упаковывают в тубы.

Тубы вместимостью 30,0 г (тубы АВЛ, диаметр тубы - 25 мм), с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой.

СРОК ГОДНОСТИ

2 год.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Хранить в недоступном для детей месте.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА ИЗ АПТЕК

Без рецепта.

ВЛАДЕЛЕЦ РЕГИСТРАЦИОННОГО УДОСТОВЕРЕНИЯ

ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», 300004, РФ, Тульская обл., г. Тула, Торховский пр-д, 10, тел. +7 (4872) 41-81-14, +7 (4872) 41-04-73, +7 (4872) 41-10-53, info@farmfabrica.ru

НАИМЕНОВАНИЕ, АДРЕС ПРОИЗВОДИТЕЛЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО**ПРЕПАРАТА**

ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», 300004, РФ, Тульская обл., г. Тула, Торховский пр-д, 10, тел. +7 (4872) 41-81-14, +7 (4872) 41-04-73, +7 (4872) 41-10-53, info@farmfabrica.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Акт внедрения научных результатов в учебный процесс Кафедры фармацевтическая технология

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной
работе ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И. М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
Т.М. Литвинова



20 07 г.

АКТ *№ 12*

внедрения в учебный процесс
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
результатов диссертационного исследования

Бркич Л.Л.

на тему: «Разработка состава и технологии получения комбинированного лекарственного
препарата на основе хитозансодержащих фармацевтических субстанций»

Мы, нижеподписавшиеся, д.ф.н., профессор, заведующий кафедры фармацевтической технологии Краснюк Иван Иванович, д.ф.п., профессор кафедры фармацевтической технологии Демина Наталья Борисовна, к.ф.н., доцент, старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии Растопчина Ольга Вячеславовна, удостоверяем факт внедрения результатов научной работы Бркич Л.Л. в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Материалы исследования используются при чтении лекций и проведении семинаров для студентов 4, 5 курсов и ординаторов.

Зав. каф. фармацевтической технологии
д.ф.н., профессор

И.И.Краснюк

Профессор каф. фармацевтической технологии
д.ф.н., профессор.

Н.Б.Демина

Ст. преподаватель, каф. фармацевтической технологии
к.ф.н., доцент

О.В.Растопчина