

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

АЛЕШИН СЕРГЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ
ИННОВАЦИОННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА В РАМКАХ
РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ СТРАТЕГИИ ФАРМА 2020**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Раменская Галина Владиславовна

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Стратегия Фарма 2020.....	11
1.2 Классификация и краткая характеристика фармакологического действия противовирусных лекарственных препаратов	12
1.3 Классификация и краткая характеристика фармакологического действия лекарственных препаратов, предназначенных для терапии заболеваний, вызванных вирусом простого герпеса, Varicella zoster, вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса.....	14
1.4 Использование германийсодержащих лекарственных препаратов в противовирусной терапии	20
1.5 Ациклогерманий	26
1.6 Структура нормативной документации	32
1.7 Требования к составлению нормативной документации для инновационной фармацевтической субстанции	33
1.8 Требования к содержанию нормативной документации для мягких лекарственных форм	35
1.9 Выводы к Главе 1.....	37
ГЛАВА 2. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ АНАЛИЗА АЦИКЛОГЕРМАНИЯ	38
2.1 Объекты исследования.....	38
2.2 Реактивы и растворители.....	41
2.3 Фармацевтические субстанции	41
2.4 Оборудование.....	42

2.5	Изучение физико-химических свойств субстанции ациклогермания.....	44
2.5.1	Внешний вид субстанции ациклогермания	44
2.5.2	Растворимость субстанции ациклогермания	44
2.5.3	Прозрачность и цветность раствора субстанции ациклогермания	44
2.5.4	pH раствора.	46
2.6	Изучение спектральных характеристик ациклогермания	47
2.6.1	Спектрометрия в инфракрасной области при анализе ациклогермания	47
2.6.2	Атомно-абсорбционная спектрометрия фрагмента германия в составе ациклогермания	52
2.7	ВЭЖХ при анализе субстанции ациклогермания	56
2.7.1	Введение	56
2.7.2	Валидация методики количественного определения ацикловира в составе ациклогермания методом ВЭЖХ с УФ-детектированием	61
2.7.3	Разработка и частичная валидация методики количественного определения фрагмента ацикловира в составе ациклогермания методом ВЭЖХ с масс-селективным детектированием	75
2.7.4	Идентификация основной примеси ациклогермания	79
2.7.5	Валидация методики количественного определения гуанина в субстанции ациклогермания методом ВЭЖХ с УФ-детектированием	85
2.7.6	ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием при анализе ациклогермания.	91
2.8	Применение химических реакций для определения подлинности ациклогермания.	93
2.9	Выводы к Главе 2.....	96
ГЛАВА 3. УСТАНОВЛЕНИЕ НОРМ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ОБРАЗЦОВ СУБСТАНЦИИ АЦИКЛОГЕРМАНИЯ.....		97

Выводы к Главе 3.	101
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ АЦИКЛОГЕРМАНИЯ	102
4.1 Объекты и методы исследования.....	102
4.2 Модификация методов качественного и количественного анализа ациклогермания для анализа лекарственной формы.....	103
4.3 Установление срока хранения лекарственной формы ациклогермания методом ускоренного старения.....	104
4.4 Выводы к Главе 4.....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	111
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	111
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	112
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	122
Приложение 1. Установление норм качества субстанции ациклогермания. Проект нормативной документации.	122
Приложение 2. Установление норм качества лекарственной формы ациклогермания. Проект нормативной документации.	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования Заболевания, вызванные вирусом простого герпеса, опоясывающего герпеса, вирусом Эпштейна-Барра и цитомегаловирусом являются одними из самых распространенных в человеческой популяции среди вирусных инфекций. Данные заболевания способны в значительной степени снижать показатели качества жизни пациентов, а в отдельных случаях приводить к серьезным осложнениям, вплоть до летального исхода. Распространенность данных заболеваний, а также присущая их возбудителям высокая способность к адаптации, являются причинами актуальности создания новых, эффективных и безопасных лекарственных препаратов, направленных на борьбу с ними. Кроме того, разработка и производство инновационных лекарственных средств является одной из основных задач, стоящих перед российской фармацевтической отраслью в рамках реализации Стратегии развития Фарма 2020 [35].

Ациклогерманий представляет собой оригинальное германийорганическое комплексное соединение, синтезированное российской компанией «ВДС Фарма» [39]. Данное вещество обладает, с одной стороны, выраженным вирустатическим действием, реализуемым благодаря фрагменту ацикловира, который, в составе комплексной молекулы, обладает более высокими показателями растворимости в биоревалентных средах и биодоступности, по сравнению с присутствующими на рынке препаратами ацикловира, а с другой, предположительно, оказывает дополнительный иммуномодулирующий эффект, характерный для германийорганических лекарственных средств. Таким образом, препарат, предположительно, реализует комплексный подход к терапии, направленный, с одной стороны, на ликвидацию возбудителя заболевания, а с другой на активацию собственного иммунного ответа организма.

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

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

Степень разработанности темы исследования. На момент начала работы по теме диссертации не существовало нормативной документации для субстанции и лекарственной формы ациклогермания, состав примесей, присутствующих в субстанции, является неизученным. Все вышесказанное определяет актуальность работы по разработке нормативной документации для субстанции ациклогермания и лекарственной формы (геля водорастворимого).

Цель исследования. Целью настоящей работы являлась разработка подходов к стандартизации инновационного лекарственного средства ациклогермания (фармацевтической субстанции и лекарственной формы).

Задачи исследования:

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

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

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

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

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

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

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

Впервые определены основные показатели качества и разработаны методики фармацевтического анализа для мягкой лекарственной формы ациклогермания.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

На основании проведенных исследований были разработаны методы фармацевтического анализа субстанции ациклогермания. Разработаны методы анализа для мягкой лекарственной формы. Оформлены проекты НД для субстанции и мягкой лекарственной формы. Результаты исследований использованы при внедрении в производство стоматологического геля

Герпенокс©, запатентованного средства для комплексного лечения и профилактики инфекционно-воспалительных состояний и микротравм слизистой оболочки полости рта, красной каймы губ и кожи вокруг них, в том числе вызванных вирусом герпеса; регистрационный номер: РЗН 2013/526 [11].

Основные положения, выносимые на защиту.

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

Методология и методы исследования. Спектральные свойства субстанции ациклогермания были изучены методами УФ- ИК- АА-спектрометрии. Количественное определение и идентификация примесей осуществлялась методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС.

Достоверность научных положений и выводов Диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне. В ходе выполнения исследования использованы современные фармакопейные методы (ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС/МС и другие), соответствующие поставленным целям и

задачам. Экспериментальные данные, полученные автором, достоверны, обработаны с применением методов современной статистики. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы, достоверны и логично вытекают из полученных автором экспериментальных данных. Первичная документация исследования проверена и полностью соответствует материалам, содержащимся в работе.

Апробация результатов исследования. Материалы исследования были изложены на конференции «Достижения и перспективы молодых ученых

НИИФ (результаты работы дипломников / аспирантов / докторантов / соискателей)» (Москва, 2015 г.), на Факультетской научно-практической конференции, посвященной 110-летию со дня рождения Заслуженного деятеля науки СССР, д.б.н., профессора Швайковой М.Д. (Москва, 2015 г.) на VII Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2018 г.). Апробация работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Протокол № 8 28.04.2018).

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

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

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

Связь исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева

Института Фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (номер государственной регистрации 01.2.011.68237). Соответствует плану научных исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации Первого МГМУ имени И.М. Сеченова «Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01.2.009.07145).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работы, из них 3 в изданиях из перечня ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 138 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 33 рисунками. Список литературы включает 108 источников, в т. ч. 41 – на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Стратегия Фарма 2020

Утвержденная Приказом № 965 Минпромторга России от 23 октября 2009 года Стратегия развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года, Фарма 2020, является одним из важнейших нормативных документов, определяющих развитие фармацевтической отрасли в современной России [35]. В настоящее время любая деятельность в сфере разработки, регистрации и контроля качества лекарственных средств, осуществляемая на территории РФ, так или иначе может рассматриваться в контексте данной Стратегии.

В данном документе выделяется несколько основных задач, которые должны быть решены отраслью в указанный срок, среди которых можно выделить следующие: оптимизация государственного регулирования цен с целью повышения доступности отечественных лекарственных средств для различных групп потребителей; сохранение и расширение ассортимента отечественных лекарственных средств (в том числе за счет воспроизведенных лекарственных средств); осуществление технологического перевооружения российской фармацевтической отрасли; совершенствование системы подтверждения соответствия качества лекарственных средств, включая меры по устранению избыточных административных барьеров по регистрации отечественных лекарств; подготовка специалистов для разработки и производства фармацевтической продукции в соответствии с международными стандартами, и другие.

Наибольшее значение в контексте предлагаемой работы представляет декларируемая стратегией Фарма 2020 задача стимулирования разработки и производства инновационных лекарственных средств, предназначенных для терапии социально-значимых заболеваний [50].

1.2 Классификация и краткая характеристика фармакологического действия противовирусных лекарственных препаратов

Вирусы представляют собой особую группу живых существ (классификационно выделенных в отдельное надцарство), которые способны воспроизводиться только внутри живых клеток. Обладая высоким структурным разнообразием и способностью к адаптации, вирусы являются возбудителями заболеваний, поражающих представителей всех существующих форм жизни. В человеческой популяции они являются причиной большого количества заболеваний, включая ряд болезней с крайне высокой летальностью, а также высоким эпидемическим потенциалом (входящие в перечень ВОЗ «инфекционные заболевания, вошедшие в перечень событий, способных стать причиной чрезвычайной ситуации в системе охраны здоровья в международном масштабе», согласно Приложению № 2 ММСП-2005 [12]). Как «требующие лекарственной терапии» классифицируются все вирусные заболевания, которые являются опасными для жизни или могут сопровождаться опасными осложнениями (например, гепатиты В и С, герпетический энцефалит, болезни, вызванные цитомегаловирусом при подавлении иммунитета у реципиентов при трансплантации органов, ВИЧ, лихорадка Ласса). Кроме того, специфической терапии требуют заболевания, снижающие качество жизни, в частности, вызывающие значительные косметические дефекты (например, заболевания, вызванные вирусом папилломы человека или простого герпеса).

В настоящее время существуют около 50 обладающих противовирусной активностью соединений, которые либо уже выпущены на рынок, либо могут быть сертифицированы для медицинского применения в ближайшие годы. Успехи в изучении молекулярных особенностей репликации вируса привели, в частности, к появлению новых возможностей терапии ВИЧ, вирусных гепатитов и заболеваний, вызванных цитомегаловирусом, ранее практически не поддающихся лечению. Большинство обладающих противовирусной активностью препаратов (вирустатиков) воздействуют на важные для

репликации вируса собственно вирусные, реже клеточные белки. Противовирусные препараты могут действовать на различных этапах жизненного цикла вируса, от присоединения вируса и проникновения в клетку, через репликацию вирусной ДНК или РНК, вплоть до образования новых вирусных частиц и их выхода из клетки. Большинство противовирусных препаратов препятствуют функционированию вирусных ферментов или же структурных белков. Это является основой их более или менее ярко выраженной селективности. Другие вещества связываются с клеточными белками или гликопротеинами, которые необходимы для репликации вируса внутри клетки, либо служат вирусам в качестве рецепторов.

Противовирусные препараты ингибируют размножение вируса и тем самым позволяют иммунной системе «справиться» с меньшим числом клеток, инфицированных вирусом. Некоторые вещества (например, Имихимод) только увеличивают синтез белков-цитокинов (интерферон и др.), таким образом, их механизм действия заключается в усилении собственного иммунного ответа организма.

В отличие от бактерицидных антибиотиков, противовирусные химические средства не разрушают непосредственно частицы вируса, обладая вирустатическим эффектом.

В качестве мишеней для избирательно действующей противовирусной терапии используются следующие этапы жизненного цикла вируса:

- адсорбция вируса на рецепторах клетки
- проникновение вируса в клетку
- «освобождение» вирусного генома
- формирование вирусных белков
- процесс образования молекулы вируса («упаковка»)
- выход вируса из клетки

В целях достижения максимальной селективности, вирустатические препараты должны обладать особыми свойствами. Например, их сродство к

вирусным полимеразам, должно быть по возможности наиболее высоким, а к клеточным полимеразам насколько возможно низким, чтобы удерживать побочные эффекты, связанные с ингибированием клеточных полимераз, на максимально низком уровне [96].

Иным подходом к противовирусной терапии является реализация принципа вакцинации, подразумевающего использование препаратов, усиливающих скорость и эффективность вторичного иммунного ответа при последующем контакте с возбудителем. Различают вакцины первого поколения, представляющего собой препарат целевого микроорганизма, аттенуированного различными типами воздействий. Вакцины второго поколения (биосинтетические вакцины) представляют собой рекомбинантные белки, соответствующие аминокислотным последовательностям структур вирусного белка, служащим маркером для активации иммунной системы [16]

1.3 Классификация и краткая характеристика фармакологического действия лекарственных препаратов, предназначенных для терапии заболеваний, вызванных вирусом простого герпеса, *Varicella zoster*, вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса.

Предпосылкой для эффективной противовирусной терапии является знание возбудителя. В отличие от ряда антибактериальных препаратов, ни одно противовирусное средство не обладает широким спектром действия, т.е., не может быть использовано при различных заболеваниях. В случаях, когда точного возбудителя не удастся определить (вирусологическая или клиническая дифференциация не эффективна или является ненадежной, например, при угрожающем жизни герпетическом энцефалите), противовирусную терапию проводят, исходя из предположения о возможном источнике заражения, «вслепую», вирусологический диагноз затем, при необходимости, дополняется.

Слово герпес («ползучий») впервые было использовано Геродотом в 100 веке до нашей эры, для обозначения заболеваний, сопровождающихся пузырьковыми высыпаниями на коже и слизистых оболочках и лихорадкой. В

настоящее время этот термин употребляется для обозначения заболеваний, вызванных вирусом простого герпеса (herpes simplex).

Характерной особенностью herpes simplex и родственных ему вирусов является способность к латенции, т.е. к возможности чрезвычайно длительного существования вируса в морфологически измененном виде в клетках организма носителя, при этом, в случае ослабления иммунитета зараженного, заболевание периодически рецидивирует. Таким образом, для каждого человека – носителя герпетической инфекции, вопрос эффективной противовирусной терапии является актуальным несколько раз в течение жизни [19].

В январе 2015 были обнародованы глобальные оценки ВОЗ, согласно которым вирусом простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) инфицировано более 3,7 млрд человек в возрасте до 50 лет, что составляет порядка 67% населения Земли. Вирусом ВПГ-2 (генитальный герпес) согласно оценкам ВОЗ инфицированы около 417 млн человек. Скорость распространения ВПГ-2 составляет около 20 млн новых зараженных ежегодно.

В соответствии с международными стандартами лечения герпесвирусных инфекций, препаратами выбора при терапии являются селективные ингибиторы ДНК-полимераз вируса: ацикловир, валацикловир, фамцикловир и др. [68] Кроме того, находят применение препараты с другими механизмами действия, в том числе иммуномодуляторы, патогенетические и симптоматические средства [23]. Используются препараты как синтетического, так и растительного происхождения. Краткая характеристика некоторых применяемых препаратов вместе с механизмом их действия приведена ниже.

1.3.1. Нуклеозид-аналоги

Ацикловир (ацикловиргуанозид) является характерным примером селективного вирустатического препарата, являясь высокоселективным ингибитором HSV и VZV ДНК-полимеразы. Он обладает высокой специфичностью в отношении вируса Herpes simplex (HSV), включая HSV тип 1 и HSV тип 2, вируса Varicella zoster (VZV), вируса Эпштейна-Барр (EBV) и

цитомегаловируса (CMV). Ярко выраженная селективность этого соединения достигается за счет того, что герпес-кодирующие тимидинкиназы сначала выборочно фосфорилируют до ацикловир-монофосфата ацикловир и его производные после их проникновения в клетку. Поэтому ацикловира монофосфат образуется только в инфицированных вирусом клетках: так как нефосфорилированная молекула не обладает активностью, неинфицированные клетки не повреждаются. Клеточные киназы затем образуют ди- и трифосфаты ацикловира. ДНК-полимераза встраивает ацикловир-трифосфат в виде аналога нуклеотида в вирусную ДНК: так как теперь отсутствует следующий нуклеотид, который может быть синтезирован в молекуле ДНК, происходит так называемый обрыв цепи (обрыв нити): препарат, таким образом, выступает в качестве конкурентного ингибитора вирусной ДНК-полимеразы [71]. Существуют различные типы вирусной тимидинкиназы, HSV, VZV, EBV, HHV-6, а ацикловир, однако, активен преимущественно при HSV и VSV, действие против EBV и HHV-6 не столь выражено [86, 53].

Максимальная растворимость в воде при (при 25 °C) ацикловира натриевой соли составляет около 100 мг/мл, биодоступность препарата около 20 %. При приеме **валацикловира** гидрохлорида (пролекарства, в организме быстро и полностью переходящего в ацикловир) в дозе 1000 мг абсолютная биодоступность ацикловира составляет $54,5 \pm 9,1\%$, при растворимости субстанции более 170 мг/мл [92, 78]. Таким образом, можно выдвинуть предположение о наличии зависимости биодоступности ацикловира от растворимости в воде. Следует отметить, что подобная зависимость характерна для многих лекарственных средств [47].

Валганцикловир представляет собой пролекарство — L-валиловый эфир **ганцикловира**, после приема внутрь переходит в ганцикловир под действием кишечных и печеночных эстераз [66]. Ганцикловир подавляет синтеза вирусной ДНК путем конкурентного ингибирования встраивания дезоксигуанозина трифосфата в ДНК под действием вирусной ДНК-полимеразы, включением

ганцикловира трифосфата в вирусную ДНК, приводящим к прекращению удлинения вирусной ДНК [67].

При длительном лечении или повторном применении нуклеозид-аналогов у больных, в особенности на фоне выраженного иммунодефицитного состояния, развивается устойчивость вирусов *Herpes simplex* и *Varicella zoster* к ацикловиру. Резистентность к нуклеозиданалогам может развиваться по одному из четырех механизмов [75]: 1) отсутствие продукции вирусной тимидинкиназы (TK-negative mutants);

2) частичное уменьшение продукции вирусной тимидинкиназы (TK-partial mutants);

3) изменение специфичности субстрата вирусной тимидинкиназы, что приводит к фосфорилированию тимидина, но не ацикловира (TK-altered mutants);

4) изменение вирусной ДНК-полимеразы (DNA polymerase mutants) [90]. Чаще регистрируются первые два механизма развития резистентности. В большинстве клинических изолятов, полученных от ацикловир-резистентных больных, обнаруживается относительный дефицит вирусной тимидинкиназы, либо нарушение структуры вирусной тимидинкиназы или ДНК-полимеразы [91]. На основании этого можно сделать вывод об особой важности собственной иммунной реакции пациента при проведении противовирусной терапии и, как следствие, целесообразности дополнительного использования в терапии иммуномодулирующих лекарственных препаратов [38].

Ряд используемых в фармацевтической практике нуклеозид-аналогов также обладают определенной противогерпетической активностью, однако показаны, в первую очередь при других вирусных заболеваниях, таких как вирусные гепатиты и ВИЧ. К таким препаратам относятся фосфонаты аналогов нуклеозидов: **цидофовир** [69], **адефовир** [70], **тенофовир** [85]. Вещества данной группы отличаются низкой скоростью проникновения в клетки в связи с их высокой полярностью и низкой липофильностью.

Более высокой способностью проникать через клеточные мембраны обладают сложные эфиры фосфонатов ациклических нуклеозидов [77]. Вещество этой группы **адефовир дипивоксил** используется при лечении герпеса при дозировке около 10 мг/сутки [79, 94, 103].

Ряд других синтезированных соединений нуклеозидной природы находятся на различных стадиях изучения с целью установления перспективности их применения в качестве лекарственных средств [87, 83].

1.3.2. Препараты не нуклеозидной природы

В настоящее время широкое применение для лечения герпетических инфекций находит ряд препаратов растительного происхождения, сочетающих клиническую эффективность с минимальной выраженностью нежелательных лекарственных реакций [44]. **Гипорамин** представляет собой сухой экстракт на основе полифенольного комплекса, полученный из листьев облепихи крушиновидной, данный препарат непосредственно блокирует синтез вирусной ДНК (основное действующее вещество – гидролизуемые танины, не менее 60% в пересчете на казуаринин) [24]. Схожим механизмом действия обладает **панавир** – экстракт побегов паслена клубневидного, содержащий гексозные гликозиды, дополнительно для данного препарата описано общее иммуномодулирующее действие [14, 27]. **Хелепин**, экстракт леспедецы двуцветной, содержащий сумму флавоноидов, оказывает вирулицидный эффект при местном применении [10]. **Алпизарин** – экстракт копеечника алтайского и копеечника желтоватого, его действующим веществом является гликозид ксантоновой природы мангиферин, блокирующий проникновение вируса внутрь клетки [49]. Для **госсипола**, экстракта семян и корней лопчатника лохматого, описан комбинированный механизм действия: прямое инактивирующее воздействие на вирус за счет взаимодействия с оболочечными белками вирусных частиц, а также опосредованное иммуномодулирующее, благодаря индукции интерферонов. Описана противогерпетическая активность **экстрактов манжетки обыкновенной** [29].

Тромантадин, противовирусное средство для наружного применения. Активен в отношении вирусов Herpes simplex 1-го и 2-го типов, Herpes zoster. Ингибирует адсорбацию и проникновение вирусов внутрь клетки [95, 32].

Витагерпавак, вакцина, содержащая специфические инактивированные антигены вирусов простого герпеса (ВПГ) I и II серотипов, полученного путём репродукции в культуре перевиваемых клеток Vero B. Лечебный эффект герпетической вакцины связан с активацией специфической реакции противовирусного иммунитета, усилением активности лимфоцитов больных, которая сохраняется в течение нескольких месяцев после окончания вакцинации [8, 9, 20].

Аллокин-альфа, имуномоделирующий препарат, по характеру фармакологического действия наиболее сходен с α -интерфероном [15].

Инозин пранобекс, препарат, обладающий комбинированным механизмом действия: способностью подавлять синтез и-РНК вирусов, а также активизировать синтез цитокинов и повышать фагоцитарную активность макрофагов (имуномодулирующий эффект) [48, 45].

Докозанол, многоатомный насыщенный спирт, содержится в составе поликозанола. Используется в косметической промышленности в качестве смягчителя и эмульгатора. Для соединения описаны противовирусные свойства, механизм действия на данный момент изучен недостаточно [18].

Гепон представляет собой синтетический имуномодулятор пептидной природы. Препарат индуцирует альфа-, бета- и гамма-интерфероны, активирует нейтрофильные гранулоциты, привлекает моноциты (макрофаги) в зону воспаления, усиливает синтез антител, за счет чего значительно повышает способность иммунной системы противостоять инфекциям, в том числе, вирусной этиологии. Описана эффективная монотерапия гепоном против заболеваний герпетической природы [30].

1.4 Использование германийсодержащих лекарственных препаратов в противовирусной терапии

Как было отмечено ранее, иммуномодулирующий эффект является одним из механизмов действия противовирусных лекарственных средств (напр. аллокин-альфа), кроме того, иммунное состояние пациента напрямую влияет на эффективность проводимого лечения. Исходя из этого, представляется целесообразным создание комплексных лекарственных препаратов, сочетающих собственно противовирусный и иммуномодулирующий механизмы действия.

Германий – химический элемент главной подгруппы 14 группы 4 периода периодической системы химических элементов Д. И. Менделеева, атомный номер 32. В свободном состоянии германий сверхвысокой чистоты представляет собой хрупкое вещество серо-белого цвета, с металлическим блеском. В химических соединениях проявляет катионогенные (Ge II) и анионогенные (Ge IV) свойства, устойчивые валентности +2 и +4, характерны металлоорганические соединения различного строения. Соединения германия находят применение в некоторых отраслях промышленности, в частности, при производстве инфракрасных оптических элементов, оптоволокон, а также полупроводниковых приборов. Мировая добыча составляет порядка 400 тонн в год [52].

Согласно принятой в биогеохимии классификации германий относится к микроэлементам, его содержание в норме составляет 10^{-6} – $10^{-5}\%$ от массы тела человека [17]. Германий обнаруживается во многих органах организма человека (селезенка, печень, желудок, поджелудочная железа, головной мозг и др.). В частности, его содержание в мышечной ткани составляет $0,14 \times 10^{-4}\%$, содержание в крови 0,44 мг/л. Ежедневное поступление германия с пищей в норме рекомендуется от 0,4 до 1,5 мг [43]. Природными источниками германия являются дикорастущие (но не искусственно культивируемые) женьшень, чеснок, алоэ, бамбук, трубчатые грибы и т.д. В большинстве случаев в живых

организмах атомы германия связаны с органическими молекулами и существуют в виде германийорганических соединений или комплексов, обладающих низкой токсичностью и высокой биологической активностью.

Первые данные, касающиеся возможного позитивного влияния германия на организм человека, в частности, стимулирования процесса кроветворения, были получены еще в первой трети двадцатого века, благодаря работам немецкого ученого Вернера Кейла.

Согласно исследованиям А.И Войнар (1960 г.) употребление натриевой соли германия увеличивает концентрацию красных кровяных телец, что позволяет отнести соединения германия к биологическим стимуляторам. Позже ВОЗ была признана жизненная необходимость (эссенциальность) ультрамикродоз германия для нормального функционирования иммунной системы [28].

В 1950-х гг. возможность применения германия в медицинских целях была исследованы в работах японского ученого Казухико Асаи, впоследствии возглавившего Токийский научно-исследовательский институт германия. При его участии в 1970-80-х годах были проведены первые исследования биологические активности германий-органических соединений [54].

В конце 1960-х гг. К. Асаи синтезировал полимерное органическое соединение германия, каждый атом германия в котором связан с атомами кислорода и остатками пропионовой кислоты [55].

Необходимо отметить, что в своей работе К. Асаи опирался на разработки советских ученых, которые в середине 1960-х гг. впервые синтезировали ряд германийорганических соединений, которые в последствии легли в основу Ge-132. Первые органические соединения германия были получены Т. К. Гар, В. Ф. Мироновым, Е. М. Берлинер и др. путем присоединения тригалогенгерманов к различным органическим соединениям с двойной связью с последующей дегидратации [89]. В результате данной схемы синтеза позднее был впервые получен и Ge-132 (сесквиоксид германия на основе пропионовой кислоты).

Германий-132 (синонимы: КГС, 2-карбоксиэтилгермсесквиоксан, *propagermanium*, Ge-132, *proxigermanium*, *germanium sesquioxide*, 2-carboxyethylgermasesquioxane) является первым синтезированным и наиболее изученным германий-органическим соединением, нашедшим применение в практической медицине [56]. Во многом это определило то, что во многих иностранных источниках информации термины «*organicgermanium* (органический германий)» и «германий-132 (*germanium-132*)» воспринимаются как синонимы, что может вносить определенное недопонимание и вводить в заблуждение при поиске и изучении других германийорганических соединений.

Разработанный японскими учеными Германий-132 в результате исследований показал ряд терапевтических эффектов, в частности противоопухолевый, противовирусный, интерферониндуцирующий (в т.ч., индуцирующий образование гамма-интерферона), радиопротективный, антимуtagenный, гепатопротекторный, антигипоксанта́ный и другие [100, 99, 58, 59, 73, 76, 81, 106].

В частности, в результате исследований было выявлено значительное увеличение активности Т-клеток-киллеров и активацию макрофагов у мышей после перорального введения Ge-132, что привело к выраженному противовирусному эффекту препарата (объектами исследования было несколько разных вирусов, в том числе несколько штаммов вирус гриппа). При этом прямое угнетающее воздействие германия на жизнедеятельность вируса не было обнаружено: все эффекты были опосредованы усилением собственного иммунного ответа организма [108, 47, 4, 74, 109, 58, 60].

Японскими учеными была также была исследована противоопухолевая активность Ge-132. При введении цельной сыворотки крови, полученной от мышей, получивших дозу Ge-132, или же при пассивной передаче фракции макрофагов мышам-носителям асцитной опухоли, наблюдалось статистически значимое ингибирование роста злокачественного новообразования. При этом при введении контрольной группе зараженных мышей сыворотки или

макрофагов от здоровых особей, не контактировавших с органическим германием, никакого положительного эффекта не было обнаружено. Также при дополнительном введении одновременно с сывороткой, полученной от мышей после приема Ge-132, веществ, токсичных для элементов сыворотки крови, не было обнаружено противоопухолевой активности, также, как и при получении сыворотки от особей с предварительно искусственно сниженным количеством Т-клеток. Таким образом, можно сделать вывод о том, что часть механизма противоопухолевой активности препаратов германия заключается в стимулировании деятельности Т-клеток, а именно в индуцировании повышенного производства циркулирующих лимфокинов. Дополнительные исследования показали, что препараты германия эффективно подавляют развитие как аллогенных, так и сингенных опухолей у мышей [63, 101].

В настоящее время в Японии германий-132 клинически применяется в качестве лекарственного средства для лечения хронического гепатита В.

К недостаткам германия-132 можно отнести его склонность к полимеризации, а также низкую водную растворимость, повышающую риск накопления германия в организме. Водорастворимая форма германий-132 экспериментально была получена корейскими учеными только в 2010 г [65].

ЛД₅₀ для мышей при пероральном введении германия-132 составляет 2.8 г/кг [62].

Кроме этого технологическая сложность, трудоемкость и многостадийность процесса синтеза, а также необходимость использования агрессивных реагентов накладывают особые требования к контролю процесса синтеза и качеству препарата, особенно к отсутствию примесей нерастворимого диоксида германия в конечном продукте, которые могут привести (особенно при длительном применении) к интоксикацией германием [93].

В 70-х годах в США был разработан и запатентован другой германийорганический препарат спирогерманий (spirogermanium) (2-(3-диметиламинопропин)-8,8-диэтил-2-аза-8-гермаспиро[4,5]-декан),

применяемый для лечения, в частности лимфосаркомы яичников, при раке толстой кишки и ряде других онкозаболеваниях.

В этом органическом соединении один атом углерода в кольцевой структуре заменен на атом германия. В сравнении с Ge-132 спирогерманий обладает принципиально иным механизмом действия, за счет содержания германия в гораздо большем относительном количестве. Действие спирогермания заключается в интенсивном подавлении активности ДНК и синтеза РНК молекул в опухолевых клетках различной природы, в частности, асцитической карциносаркомы. Важным преимуществом препарата является отсутствие гематологической токсичности, основные побочные эффекты препарата – вялость и головокружение [57, 61].

В качестве иллюстрации действия спирогермания можно привести результаты клинического исследования, проведенного в 1982 году в США с привлечением группы пациентов с раком яичников в поздней стадии. По результатам исследования у всех пациенток наблюдалось улучшение качества жизни, частичная ремиссия на фоне приема препарата была зафиксирована у 11% контрольной группы. По результатам исследования спирогерманий был рекомендован в качестве препарата для терапии рака яичников [105].

В этот же период были проведены исследования по определению токсической дозы спирогермания. Установленная ЛД₅₀ для мышей при пероральном введении составила 224 мг/кг, при внутрибрюшинном 150 мг/кг [80].

Кроме того, были проведены исследования возможной антималярийной активности спирогермания, связанной, предположительно, с его иммуномодулирующим действием [88].

В настоящий момент спирогерманий и его аналоги остаются признанными противоопухолевыми препаратами и, наряду с соединениями платины, используются в разных странах мира при лечении онкологических заболеваний (согласно классификации EPhMRA, входит в группу «разные синтетические

препараты»). Однако его широкое применение в последнее время ограничено повышенным риском нейротоксичности.

Также из коммерческих германийорганических продуктов можно отметить санумгерман (sanumgerman) (лактат-цитрат-германат калия), разработанный в 1970-х гг. в Германии при тесном сотрудничестве с К. Асаи и выпускаемый в настоящее время немецкой компанией Sanum-Kehlbeck в качестве гомеопатического средства. В середине 1980-х годов активные работы по изучению германийорганических соединений были начаты в Южной Корее доктором Цанг Ук Сон (Dr. Tsang Uk Sohn). В результате этой деятельности появился препарат Био-германий (Bio-Germanium), получаемый методом дрожжевого культивирования. Био-германий производится в настоящее время южнокорейской компанией GerantiPharm и позиционируется в качестве противоракового и иммуностимулирующего средства [98, 64, 84].

Волна популярности препаратов германия (особенно для лечения раковых и иммунных (в.т.ч. СПИД) заболеваний) привела в 1980-1990-х гг. к появлению на рынке большого количества биологически активных добавок, содержащих в основном Ge-132. Неконтролируемое и недоброкачественное производство таких добавок в ряде азиатских стран и их активные поставки в страны Европы, США и Японию привели к тому, что в 1990-х годах появился ряд научных исследований, описывающих как минимум 31 случай (в том числе летальные) интоксикации, предположительно связанные с приемом биодобавок с германием, так как в организмах умерших пациентов констатировалось повышенное содержание диоксида германия. При этом отмечалось, что большинство пациентов являлись тяжело больными (в том числе больные СПИД и на последних стадиях онкологических заболеваний), которые бесконтрольно и без рекомендации и наблюдений врача в течении очень длительного периода времени (до 3 лет) принимали пищевые добавки неизвестного происхождения в количествах многократно превышающих

расчетную суточную потребность (от 60 до 600мг.Ge/сут. вместо рекомендуемых для взрослого человека 1-1,5 мг/сут.) [104, 102].

В опубликованных работах, декларировалась целесообразность проведения терапии препаратами, содержащими германий, под наблюдением врача, т.е. выведение их из списка биологически активных добавок в область лекарственных средств, и усиление контроля за качеством германийсодержащих препаратов. Появление этой информации привело в итоге к принятию FDA и EMEA постановлений о запрете импорта германийсодержащих биологических активных добавок из стран Азии (при этом производство таких препаратов на территории США и европейских стран местными производителями и их оборот допускается при соблюдении всех регуляторных норм контроля качества).

Данные решения во многом оказали серьезное влияние на дальнейшие исследования в области германийорганических соединений, затормозив их на многие годы. Тем не менее, работы, посвященные синтезу новых германийорганических соединений с целью использования в качестве лекарственных средств продолжают проводиться. Так, в 2013 году были опубликованы результаты изучения положительного влияния нового германийорганического биологически активного вещества (комплексное соединение германия и оксиэтилендифосфоновой кислоты с медью, рабочее название **медгерм**) на состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему у крыс при остром галактозаминовом гепатите [51].)

1.5 Ациклогерманий

В основе создания инновационного российского препарата ациклогермания лежит идея использования комбинации эффективного противовирусного препарата ацикловира с германийорганическим компонентом, усиливающим собственный иммунный ответ организма.

В 2010-х гг. российской компанией ООО «ВДС Фарма» был разработан оригинальный подход к синтезу новых комплексных соединений германия с

аминокислотами и карбоновыми кислотами, другими органическими соединениями (включая различные дженерики), обладающих биологической активностью и перспективных для разработки новых патентоспособных лекарственных препаратов [39, 40].

В частности, полученные комплексные соединения германия с аминокислотами или с аминокислотами и карбоновыми кислотами представляют собой белые аморфные порошки, хорошо растворимые в воде, которые имеют общую структурную формулу:



где AA – аминокислота, которая может быть выбрана из большого числа известных аминокислот; CA – карбоновая кислота.

Способ характеризуется тем, что диоксид германия (α-форма, нерастворимая в воде) переводят в водорастворимые германийорганические комплексные соединения посредством взаимодействия с аминокислотами или смесью аминокислот и карбоновых кислот. Представленные кислоты образуют в водных растворах с диоксидом германия комплексные соединения, которые устойчивы не только в водных растворах, но могут быть выделены в чистом виде. Этому способствует образование координационной связи между атомами азота и германия ($\text{N} \rightarrow \text{Ge}$), либо кислородом ОН-группы гидроксикарбоновой кислоты и германия ($\text{HO} \rightarrow \text{Ge}$).

В целом разработанный научно-технологический подход к синтезу новых германийорганических соединений является платформенным и позволяет целенаправленно разрабатывать новые молекулы для различных терапевтических направлений (противораковое, противовирусное, антибиотики, ноотропное и др.). Существенным преимуществом разработанной технологии по сравнению с другими известными является технологическая простота, отсутствие агрессивных агентов, безопасность синтеза и универсальность (возможность использования широкого спектра исходных органических соединений и/или дженериков).

В качестве исходных органических соединений для синтеза могут быть использованы как малые, так и полимерные молекулы. Спектр применения разработанного подхода достаточно широк и ограничен (на сегодняшний день) только структурными особенностями отдельных исходных молекул. Одним из значимых преимуществ метода является возможность перевода с его помощью трудно растворимых лекарственных веществ в водорастворимые, что позволяет также разрабатывать новые лекарственные формы.

Одним из мировых направлений разработки новых препаратов является создание *me-too* молекул на основе молекулы-родоначальника, превосходящих исходные соединения по своим характеристикам (эффективность, безопасность, биодоступность и др.). Основная идея состоит в создании новых патентноспособных лекарственных препаратов на основе хорошо изученных действующих веществ, при этом обладающих улучшенными характеристиками. *Me-too* молекулы решают проблемы, выявленные при изучении и использовании молекулы-родоначальника (напр. низкая растворимость и биодоступность, токсичность, побочные действия, появившаяся резистентность, ограниченный спектр действия и пр.). Так, открытие ацикловира повлекло за собой появление валацикловира, фамцикловира, пенцикловира и др. более эффективных *me-too* молекул.

На сегодняшний день компанией «ВДС Фарма» синтезировано более 50 различных новых германийорганических соединений, перспективных для разработки новых фармацевтических, лечебно-профилактических, ветеринарных, косметических, а также вакцинных препаратов.

В частности, было синтезировано новое индивидуальное комплексное соединение германия с ацикловиром – ациклогерманий. Необходимо отметить, что реализованный научный подход к модификации молекулы ацикловира является оригинальным и принципиально отличным от всех существующих в настоящее время подходов к созданию *me-too* молекул ацикловира (напр. валацикловира, фамцикловира, пенцикловира и др.).

Ациклогерманий является комплексной соединением, состоящим из двух атомов германия, фрагмента ацикловира, соединенных четырьмя цитрат-ионами и фрагментом аргинина.

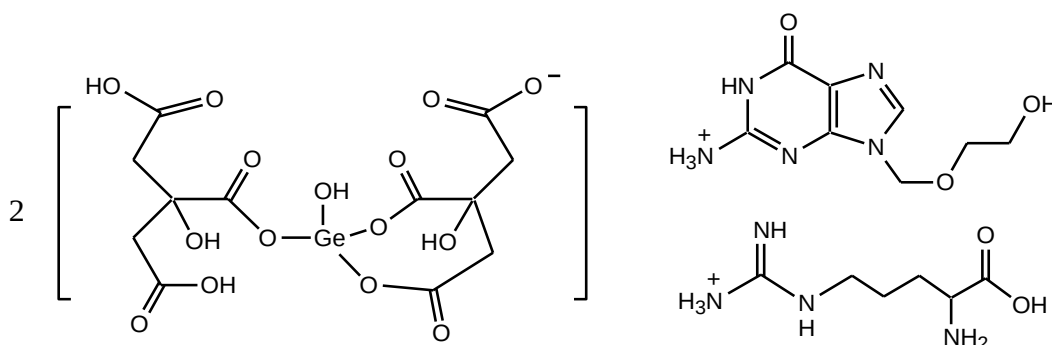


Рисунок 1. Структурная формула ациклогермания

Проведенные эксперименты и доклинические исследования показали следующие ключевые преимущества ациклогермания по сравнению с ацикловиrom (табл. 1):

- Высокая растворимость в воде (>25% у ациклогермания против 0,13% у ацикловира), буферных растворах при pH 1,2 / 4,4 / 6,8 и биорелевантных средах;
- Биодоступность ациклогермания (по ацикловириновому фрагменту) составляет >90% (vs. 15-20 % у ацикловира);
- Ациклогерманий имеет высокий класс безопасности (LD50 > 5г/кг, мыши, при оральном применении), не накапливается в организме и не обладает кумулятивными свойствами, сенсibiliзирующим, кожно-раздражающим и кожно-резорбтивным и мутагенным действиями;
- Эффективность против ацикловиру-устойчивых штаммов (в частности, против штамма «L2/R» вируса простого герпеса 1-го антигенного типа из Государственной коллекции вирусов ФГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского»);
- Показан двойной комбинированный механизм действия (2 в 1): вирусингибирующее и иммуномодулирующее, который позволяет снизить разовые и курсовые лечебные дозировки, уменьшить проявление побочных

эффектов, а также органныю и общую медикаментозную токсичность, достигнув при этом более стойкого синергичного эффекта терапии ($2 + 2 = 5$).

- Высокая водорастворимость позволяет разработать новые (в сегменте содержащих нуклеозидные аналоги противогерпетического действия) лекарственные формы (напр. гель и суппозитории), отсутствующие в настоящее время на рынке.

Таблица 1. Сравнительные характеристики ациклогермания и ацикловира

Показатель	Ацикловир	Ациклогерманий
Растворимость в воде, 20 ⁰ С	0,13%	>25%
Растворимость при рН 1,2 / 4,4 / 6,8	3,5 / 2,6 / 2,4мг/мл	>32 мг/мл
Биодоступность (по ацикловиру) per os (Caco-2, монокультура клеток аденокарциномы толстого кишечника пилотное исследование in vivo)	15%	>90%
Механизм действия	Одинарный (вирусингибирование)	Двойной (вирусингибирование + иммунотерапия)
Действие на резистентные штаммы	Слабо выражено	Показано в доклинических исследования

Сравнительные эксперименты in vivo образца геля, содержащего ациклогерманий в концентрации эквивалентной 0,5% ацикловира, были проведены на базе НИИ Вирусологии им. Ивановского. Было показано, что в экспериментальной модели генитального герпеса у морских свинок, обусловленного вирусом простого герпеса 2 типа (ВПГ-2), ациклогерманий показал терапевтическую эффективность на 23% выше коммерческого препарата – лидера рынка, содержащего 5% ацикловира (табл. 2). Это связано,

как минимум, с собственной иммуномодулирующей активностью германийорганического фрагмента, так и более высокой биодоступностью фрагмента ацикловира. При этом разница концентраций в 10 раз позволяет достигнуть более высокого уровня безопасности нового препарата.

Таблица 2. Сравнительная эффективность противогерпесных препаратов при лечении генитального герпеса морских свинок, инфицированных вирусом простого герпеса 2 типа (ВПГ-2)

№/№	Группа животных (морские свинки)	Эквивалентное содержание ацикловира в препарате	Индекс лечебного действия, ИЛД, %
1.	WDS-1 (ациклогерманий) гель 3%	0,5%	47,8*
2.	Препарат сравнения А (ацикловир) крем 5%	5%	38,86*
3.	Препарат сравнения Б (ацикловир 3% + интерферон $\alpha 2b$ + лидокаин) мазь	3%	34,78*

* $p < 0.05$

Исследования, проведенные ВДС Фарма, подтверждают некоторые общие черты, присущие новым германийорганическим соединениям:

- Увеличивается растворимость в воде и рН рН 1,2 / 4,4 / 6,8 и биорелевантных средах, по сравнению с исходными соединениями;
- Основная терапевтическая направленность, присущая исходному соединению, остается неизменной, но проявляется более выражено
- Новые соединения обладают иммуномодулирующим действием, усиливающим и пролонгирующим основное действие, что позволяет достичь совокупного терапевтического эффекта
- Новые соединения имеют высокий класс безопасности [2].

(Алешин С.В. Использование органических соединений германия в медицине / С.В. Алешин [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – № 2(11). – С. 144–150).

1.6 Структура нормативной документации

Под общим термином «Нормативная документация» понимаются, в соответствии с рекомендациями Руководства по экспертизе лекарственных средств, фармакопейные статьи конкретного предприятия, как для субстанций, импортируемых на территорию России (НД), так и производимых российскими предприятиями (ФСП), так как требования к содержанию данных документов не различаются.

Фармацевтические субстанции – это лекарственные средства в виде действующих веществ биологического, биотехнологического, минерального или химического происхождения, обладающие фармакологической активностью, предназначенные для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяющие их эффективность [35]. Наличие надлежащим образом подготовленной и оформленной нормативной документации для всех фармацевтических субстанций, которые используются при производстве лекарственного препарата, является необходимым условием для его государственной регистрации [42]. Отличия при составлении нормативной документации для фармацевтической субстанции, а не конкретного лекарственного препарата, обусловлены отсутствием необходимости контроля содержания вспомогательных веществ, а также физических параметров лекарственной формы.

Для субстанций растительного и животного происхождения, субстанции, получаемые из крови человека, субстанций, предназначенных для получения иммунобиологических лекарственных препаратов и прочих субстанций, обладающих специфическими физико-химическими свойствами, возможны отклонения от приведенных далее принципов, а также дополнительные нормы и разделы документации (например, «Специфическая активность»). Общим положением при разработке аналитических методик, как для лекарственных препаратов, так и для фармацевтических субстанций, является

приоритетность использования реактивов, индикаторов, титрованных и буферных растворов, представленных в действующей ГФ Российской Федерации. В этом случае в тексте методики приводится ссылка на соответствующий нормативный документ. При необходимости введения реактива или методики определения, не включенной в ГФ, требуется привести максимально подробное технологическое описание, с указанием всего необходимого оборудования, класса чистоты используемых веществ и других параметров [36].

1.7 Требования к составлению нормативной документации для инновационной фармацевтической субстанции

Современными требованиями российского законодательства устанавливаются 38 разделов нормативной документации для фармацевтической субстанции, а также их последовательность, при этом 17 разделов являются обязательными [34, 37]. Некоторые современные требования к заполнению основных разделов, имевшие значения для выполнения настоящей работы, приведены далее.

Раздел «Описание» включает информацию о свойствах субстанции, определяемых органолептически: цвете и запахе. Следует обратить внимание, что современными требованиями запрещается введение параметра «Вкус». Данные о степени кристалличности порошкообразной субстанции («крупнокристаллический», «кристаллический», «мелкокристаллический», «аморфный») должны быть включены в нормативную документацию, но не подлежат испытанию при рутинном анализе.

В соответствии с нормами ГФ рекомендуется включать в раздел «Растворимость» данные для не менее чем для трех растворителей разной полярности. Следует по возможности избегать использования высокотоксичных, а также летучих растворителей.

При составлении раздела «Подлинность» современные нормы подразумевают преимущественное использование инструментальных методов

анализа. Обязательным является исследование ИК-спектра вещества. При наличии в составе вещества металлов целесообразным является использование метода атомно-абсорбционной спектроскопии. Решение о ведении в нормативную документацию прочих инструментальных методов, предусмотренных Государственной Фармакопеей (спектроскопия ядерного магнитного резонанса, хроматографические методы и так далее) принимается исходя из физико-химических свойств конкретной субстанции [7, 13, 21]. Качественные реакции могут быть включены в нормативный документ как дополнение к инструментальным методам, а также для анализа вспомогательных компонентов в сложных субстанциях. Для субстанций, обладающих какими-либо специфическими свойствами, может потребоваться использование особых методов качественного анализа, в соответствии с требованиями ГФ или международными нормами (например, определение антимикробной активности для антибиотиков).

В соответствии с международными нормами, в частности, с директивой Международной Конференции по Гармонизации ICH Q1A (R2), для определения срока хранения регламентируется проведение процедуры ускоренного старения при помощи современных климатических камер, параметры: тепло-влажа [82]. В Российской Федерации в соответствии с соответствующей статьей ГФ XIII является допустимым проведение процедуры ускоренного старения с использованием только повышенной температуры.

Следует отметить, что, согласно современным требованиям, проведение прямого измерения рН в качестве метода для Раздела 17, рН или кислотность или щелочность, является предпочтительным только в тех случаях, когда раствор вещества проявляет буферные свойства. В остальных случаях предпочтительно проведение кислотно-основного титрования (кислотность или щелочность) [1].

Норма проведения исследования на Гистамин является относительно новой Российской Федерации, и впервые регламентируется соответствующей статьей ГФ XIII.

Химическое наименование на русском языке в соответствии с номенклатурой IUPAC определяется структурной формулой действующего вещества субстанции. Принципы составления корректных химических названий изложены в официальных изданиях IUPAC («Синяя книга» и «Красная книга» для номенклатуры органических и неорганических веществ соответственно). Актуальные версии данных документов регулярно публикуются в журнале «Pure and Applied Chemistry» [72].

1.8 Требования к нормативной документации для мягких лекарственных форм

Единственной разработанной лекарственной формой ациклогермания на настоящий момент является гель стоматологический. Гель – мягкая лекарственная форма, предназначенная для нанесения на кожу, раны и слизистые оболочки и состоящая из основы и равномерно распределенных в ней лекарственных веществ, при этом обладающая упруго-пластичной консистенцией и способностью сохранять свою форму, за счет использования гелеобразователей различной природы. Преимущества гелей как лекарственной формы: удобство дозирования и применения (гели на водной основе легко распределяются по поверхности и не оставляют жирных следов), высокая биодоступность действующих веществ, за счет нахождения их в геле в растворенном состоянии, большая площадь всасывания действующего вещества через кожу и слизистые оболочки. К недостаткам гелей как лекарственной формы можно отнести биологическую нестабильность (требуется введение консервантов), а также возможную нестабильность при хранении и воздействии химических факторов [6, 33]. Современными требованиями российского законодательства устанавливаются 17 разделов нормативной документации для препаратов в данной лекарственной форме, а

также их последовательность, при этом 15 разделов являются обязательными. Требования к содержанию большинства из них соответствуют ранее приведенным требованиям к содержанию соответствующих разделов нормативной документации для фармацевтических субстанций [97]. В соответствии с международными нормами в конкретную нормативную документацию могут быть добавлены дополнительные разделы, характеризующие физические свойства гелей, например, их реологические свойства: «Вязкость» и «Предел текучести». Так как для гелей может быть характерно явление синерезиса (расслоения), указывающее на нестабильность во время хранения и напрямую снижающее их потребительские свойства, введение в НД данных разделов представляется крайне желательным [46, 41] (Алешин С.В. Обзор современных требований к содержанию обязательных разделов нормативной документации для фармацевтических субстанций / С.В. Алешин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – № 4(9). – С. 202–205).

1.9 Выводы к Главе 1

Проведенный анализ литературных источников позволяет сделать выводы об актуальности разработки инновационных противогерпетических лекарственных средств, а также о возможной эффективности инновационной комплексной молекулы -- ациклогермания в качестве лекарственного средства.

Разработка нормативной документации для инновационной субстанции ациклогермания является необходимым и неотъемлемым этапом его разработки и регистрации в качестве лекарственного средства, и может рассматриваться как этап реализации Стратегии Фарма 2020.

ГЛАВА 2. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ АНАЛИЗА АЦИКЛОГЕРМАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлись образцы субстанции нового комплексного лекарственного препарата ациклогермания, промежуточные продукты его синтеза, компоненты комплексной молекулы (ацикловир, лимонная кислота, гуанин), а также образцы лекарственной формы (гель 3%). Экспериментальные образцы субстанции и лекарственной формы были синтезированы ООО «ВДС Фарма». Изучение физико-химических свойств ациклогермания, разработку методик анализа, установление сроков годности и научно-обоснованных норм качества субстанции осуществляли на базе Лаборатории Фармакокинетики НИИ Фармации Первого МГМУ им. И.М.Сечнова, а также ООО «Центр фармацевтической аналитики».

Ациклогерманий является комплексной соединением, состоящим из двух атомов германия, фрагмента ацикловира, соединенных четырьмя цитрат-ионами и фрагментом аргинина.

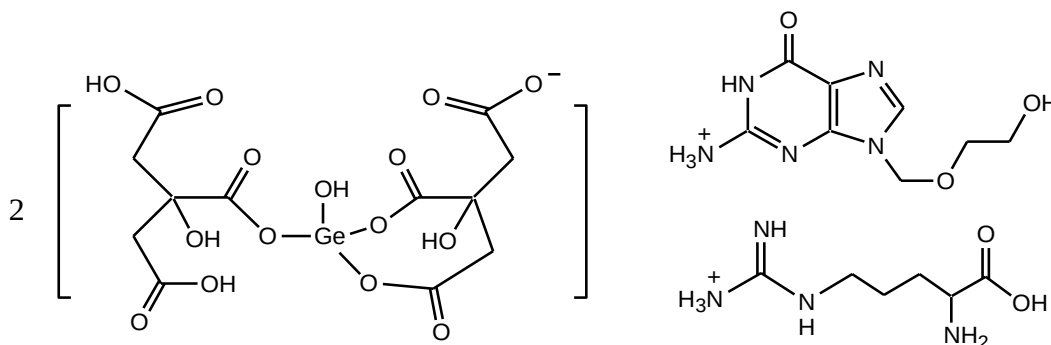


Рисунок 1. Структурная формула ациклогермания

Таблица 3. Перечень изученных образцов субстанции ациклогермания

№	Код образца субстанции	Дата начала анализа
1	WDS -1 (1)	6.10.14
2	WDS -1 (2)	6.10.14
3	WDS -1 (1)	6.10.14
4	WDS-1 от 07.04 №1	27.04.15
5	WDS-1 от 07.04 №2	27.04.15
6	WDS-1 от 07.04 №3	27.04.15
7	WDS-1 от 07.04 №4	27.04.15
8	WDS-1 (ротор)	27.04.15
9	ИБ-220	12.12.14
10	ИБ-221	12.12.14
11	ИБ-223	12.12.14

Таблица 4. Перечень изученных образцов лекарственной формы ациклогермания

№	Код серии препарата	Дата начала анализа
1	WDS-1 гель 3% 0114	24.10.14
2	WDS-1 гель 3% 0914	24.10.14
3	WDS-1 гель 3% (0915)	16.10.15
4	WDS-1 гель (07.04)	27.04.15
5	WDS-1 гель (1214)	15.01.15
6	WDS-1 гель (1013)	15.01.15

Таблица 5. Перечень изученных образцов промежуточных продуктов синтеза ациклогермания

№	Кодирование	Дата анализа
1	ИБ-301	16.10.15
2	ИБ-302	16.10.15
3	ИБ-303	16.10.15
4	ИБ-304	16.10.15
5	ИБ-305	16.10.15
6	ИБ-280 (1%)	18.06.15
7	ИБ-277(1%)	18.06.15
8	ИБ-277(0,5%)	18.06.15
9	ИБ-277 (3,5%, порошок)	18.06.15
10	ИБ-282(2%)	18.06.15
11	ИБ-281(1,3%)	18.06.15
12	ИБ-278(0,85%)	18.06.15
13	ИБ-278(3,5%, порошок)	18.06.15
14	ИБ-278 (3,5% p-p WDS на 0,55 ACV)	18.06.15
15	ИБ-290(0,9%)	06.07.15
16	ИБ-289(0,9%)	06.07.15
17	ИБ-286(1%)	06.07.15
18	ИБ-220/2(1,2%)	06.07.15
19	ИБ-291(1%)	06.07.15
20	ИБ-293	06.07.15
21	ИБ-298А	02.09.15
22	ИБ-298В	02.09.15
23	ИБ-298С	02.09.15
24	ИБ-299А	02.09.15
25	ИБ-299В	02.09.15

2.2 Реактивы и растворители

- Ацетонитрил (gradient grade, Merck, USA);
- Натрия дигидрофосфатадигидрат (Полихром, Россия);
- Кислота ортофосфорная концентрированная х/ч (Компонент-Реактив, Россия)
- Аммония формиат (Merck, USA)
- Калия бромид, для ИК, Panreac (Испания)
- L-аргинин, субстанция-порошок, Allmax (USA)
- 1-Нафтол, Biochem (Франция)
- Лимонная кислота (ч.д.а., Компонент-Реактив, Россия)
- Кальций хлористый (ч.д.а., Компонент-Реактив, Россия)

2.3 Фармацевтические субстанции

- Ацикловир, субстанция-порошок (Xiamen, Китай, 99.6%, 070701, № CAS 59277-89-3)
- Гуанин, субстанция-порошок (Xiamen, Китай, 99.8%, 714036, № CAS 73-40-5)
- Германия диоксид (ESPI Metals, № CAS 1310-53-8)

2.4 Оборудование

Хроматографический анализ ациклогермания методом ВЭЖХ проводили при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1290 series, с УФ-детектором, США, (обработку данных производили при помощи ПО Agilent Chemstation v. 7.1), а также при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1290 series, с масс-селективным детектором с тройным квадруполем (6410), обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Mass Hunter Quantitative Analysis, версия B.03.01, Agilent Technologies. Идентификацию основной примеси осуществляли при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа Waters Acquity H-class system с масс-селективным детектором (обработку данных проводили при помощи ПО MassLynx v 4.1, Waters).

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

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

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

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

Изучение реологических свойств геля ациклогермания осуществлялось при помощи ротационного вискозиметра Lamy Rheology RM 200 с коаксильными

цилиндрами ms din 33 объемом 17 мл, программное обеспечение RHEOMATIK (Франция).

Перечень вспомогательного оборудования, использованного для проведения исследований:

- весы аналитические Sartorius ED 2245, Швейцария;
- центрифуга охлаждающая Eppendorf 5424 R, Германия;
- встряхиватель типа вортекс Heidolph Reax Top, Германия;
- холодильник Hotpoint-Ariston HBM 1180.4, Россия;
- система водоподготовки Millipore, Milli-Q Advantage A10, Франция;
- дозатор пипеточный одноканальный с переменным объемом «Ленпипет Лайт» 100-1000 мкл, Россия;
- дозатор пипеточный одноканальный с переменным объемом «Ленпипет Лайт» 10-100 мкл, Россия.
- колбы мерные класса А, Shott Duran вместимостью 10, 50, 100 мл, 1 л, Германия.

2.5 Изучение физико-химических свойств субстанции ациклогермания

2.5.1 Внешний вид субстанции ациклогермания

Внешний вид субстанции ациклогермания был оценен визуально при естественном освещении. Вещество представляет из себя белый пластинчатый порошок.

2.5.2 Растворимость субстанции ациклогермания

Было проведено изучение растворимости субстанции ациклогермания в ряде растворителей различной полярности: воде, метаноле, диэтиловом эфире, гексане, с целью определения оптимального растворителя для включения характеристики «растворимость» в проект нормативной документации. Исследование проводилось в соответствии с требованиями ГФ XIII, для трех образцов субстанции, соответствующих разным производственным циклам. Результаты исследования приведены в таблице.

Таблица 6. Растворимость субстанции ациклогермания

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

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

2.5.3 Прозрачность и цветность раствора субстанции ациклогермания

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

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

2.5.4 рН раствора.

Было проведено изучение значения рН 1% водного раствора субстанции ациклогермания. Исследование проводилось в соответствии с требованиями ГФХIII, для трех образцов субстанции, соответствующих разным производственным циклам (образцы 1, 2, 3 в соответствии с таблицей 3). Результаты исследования приведены в таблице.

Таблица 7. Изучение рН водного раствора ациклогермания

Результаты измерения	
Образец	Значение рН
Wds-1 (1) 6/10/14/2	2,098
Wds-1 (2) 6/10/14/2	2,103
Wds-1 (3) 6/10/14/2	2,117

По результатам исследования было установлено, что значение рН 1% водного раствора ациклогермания достоверно укладывается в диапазон от 2,0 до 2,2. Кислая реакция среды субстанции может быть обусловлена наличием в ее составе фрагмента лимонной кислоты. С целью проверки данного предположение было произведено изучение значения рН 0,6% водного раствора лимонной кислоты (содержание лимонной кислоты в котором количественно соответствует содержанию фрагмента лимонной кислоты в 1% растворе ациклогермания). Измеренное значение рН составило 2,051.

2.6 Изучение спектральных характеристик ациклогермания

2.6.1 Спектрометрия в инфракрасной области при анализе ациклогермания

2.6.1.1 Введение.

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

2.6.1.2 Расшифровка ИК-спектра ациклогермания

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

- 3443 см⁻¹ (вторичная амидогруппа фрагмента ацикловира)
- 2937 см⁻¹ (-CH₂- группа фрагмента аргинина)
- 1724 см⁻¹ (предельная алифатическая карбоксильная группа лимонной кислоты).

Полученные данные соответствуют теоретическим представлениям о химической структуре ациклогермания (см. Главу 1.5).

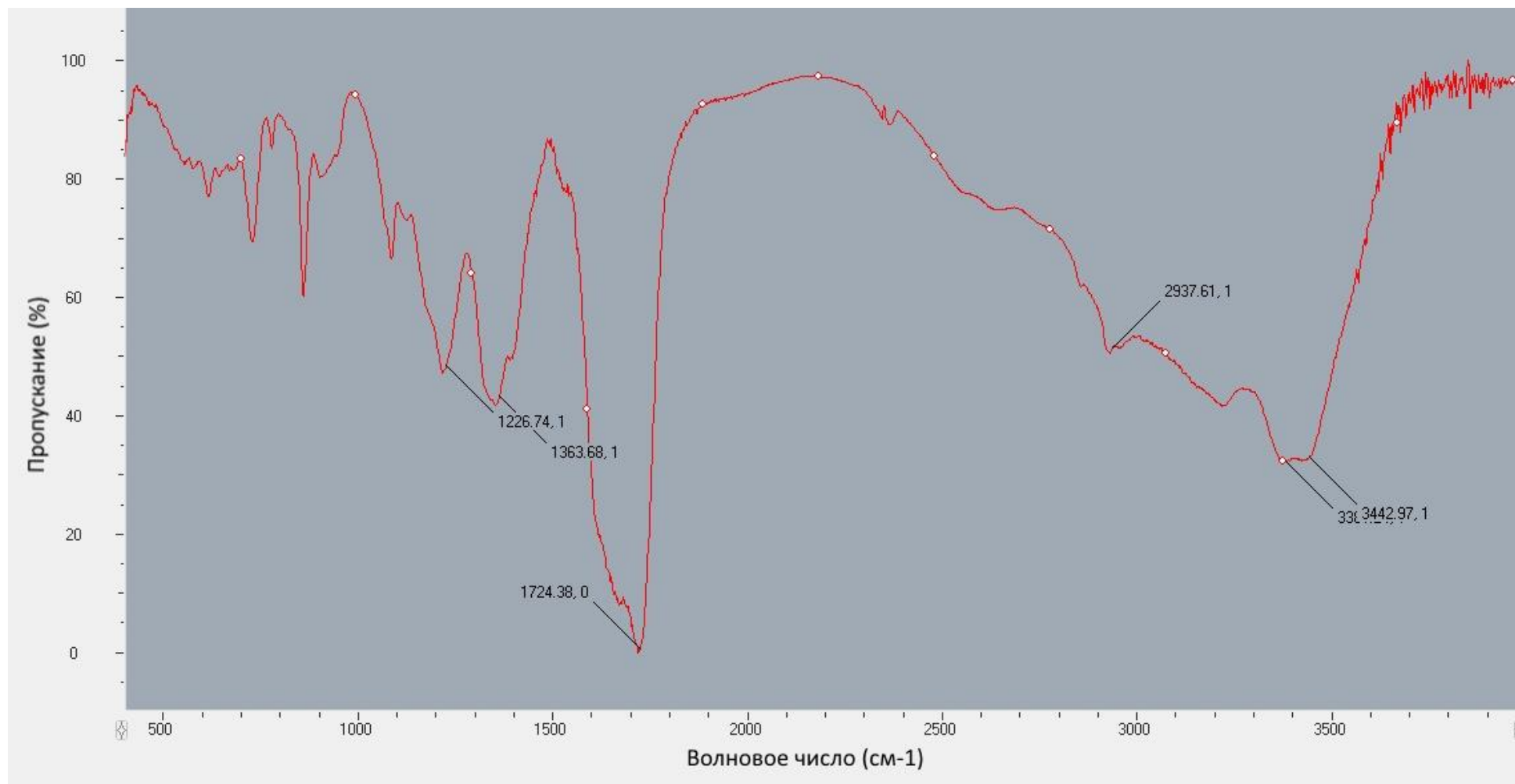


Рисунок 2. ИК-спектр ациклогермания

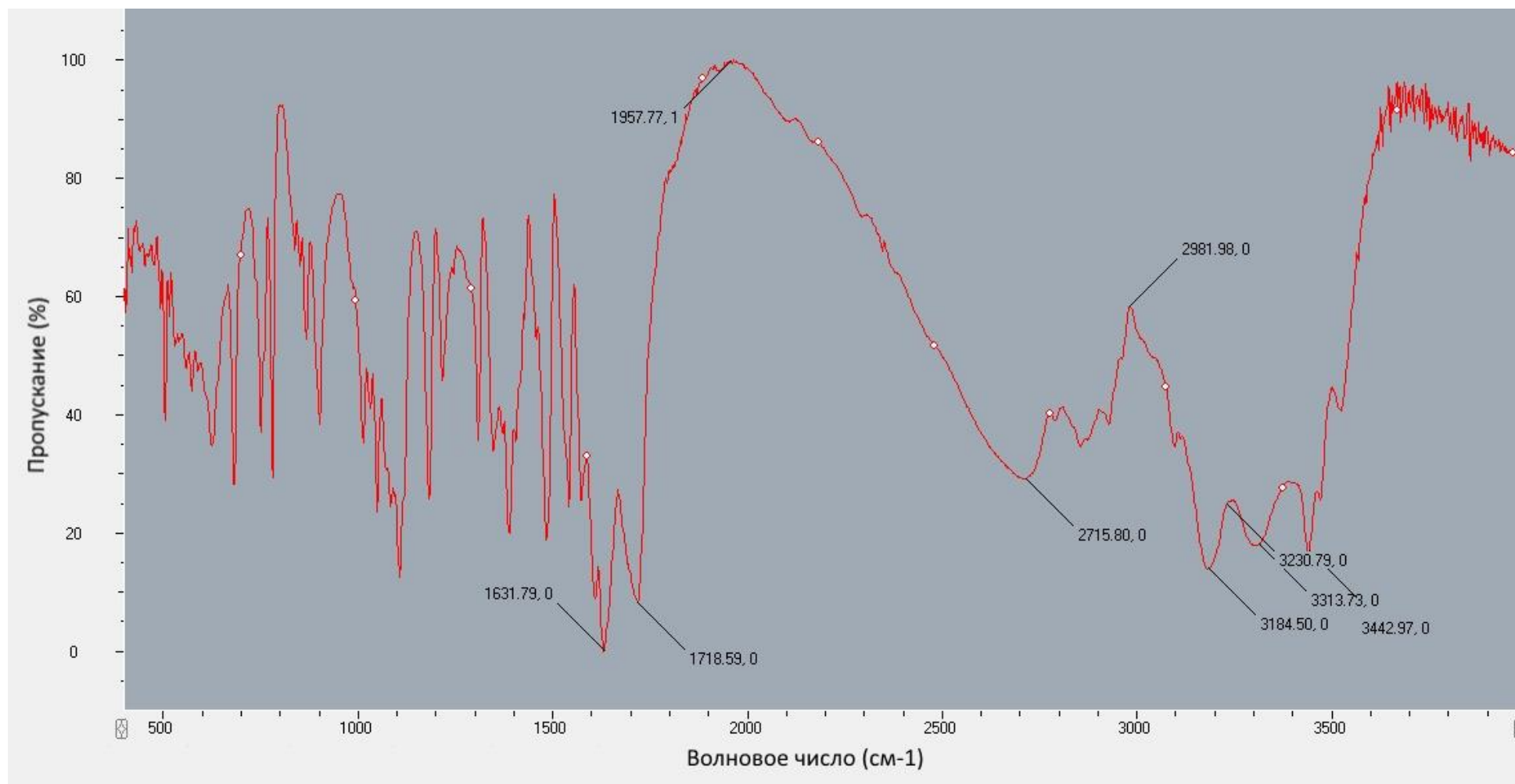


Рисунок 3. ИК-спектр ацикловира

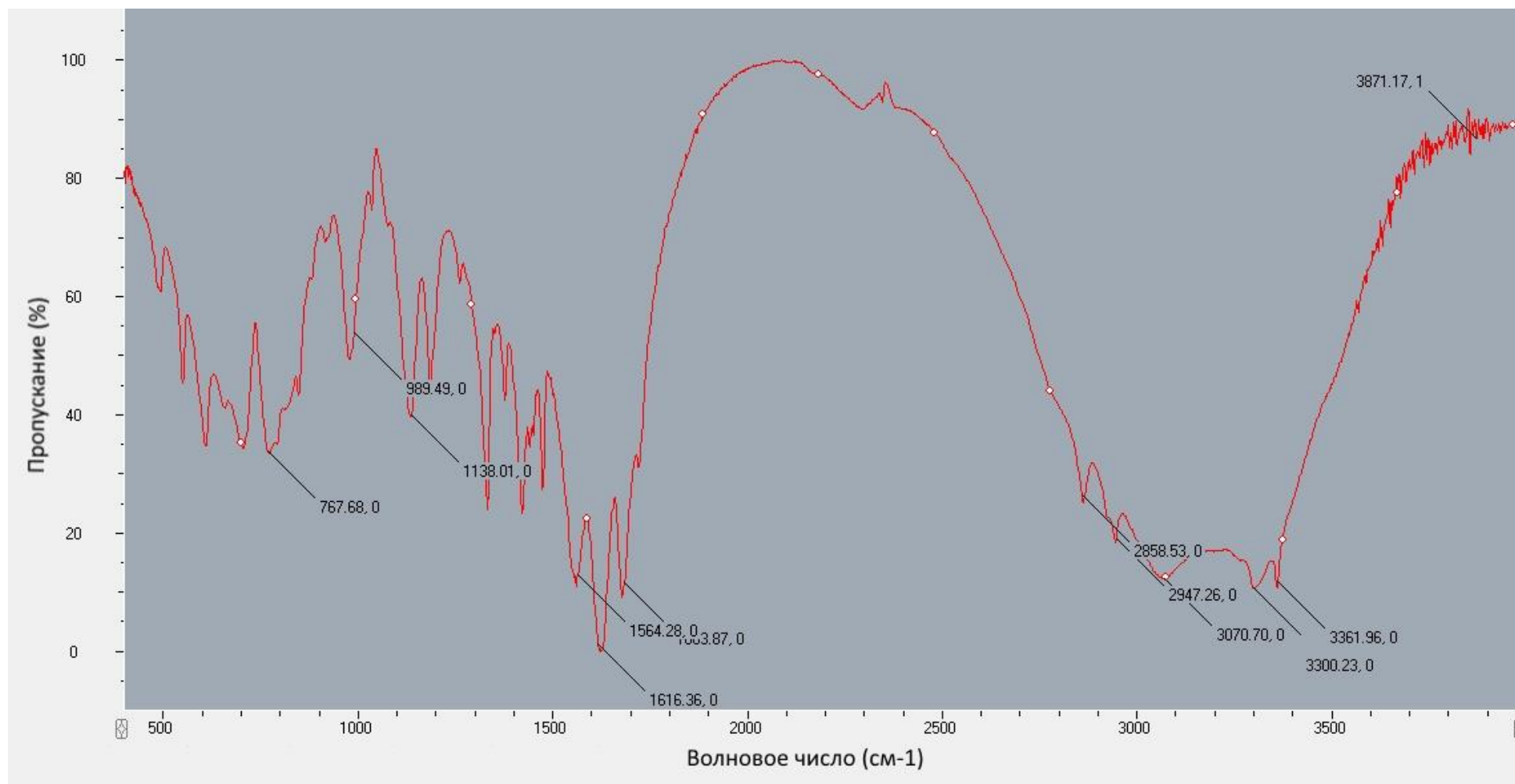


Рисунок 4. ИК-спектр аргинина

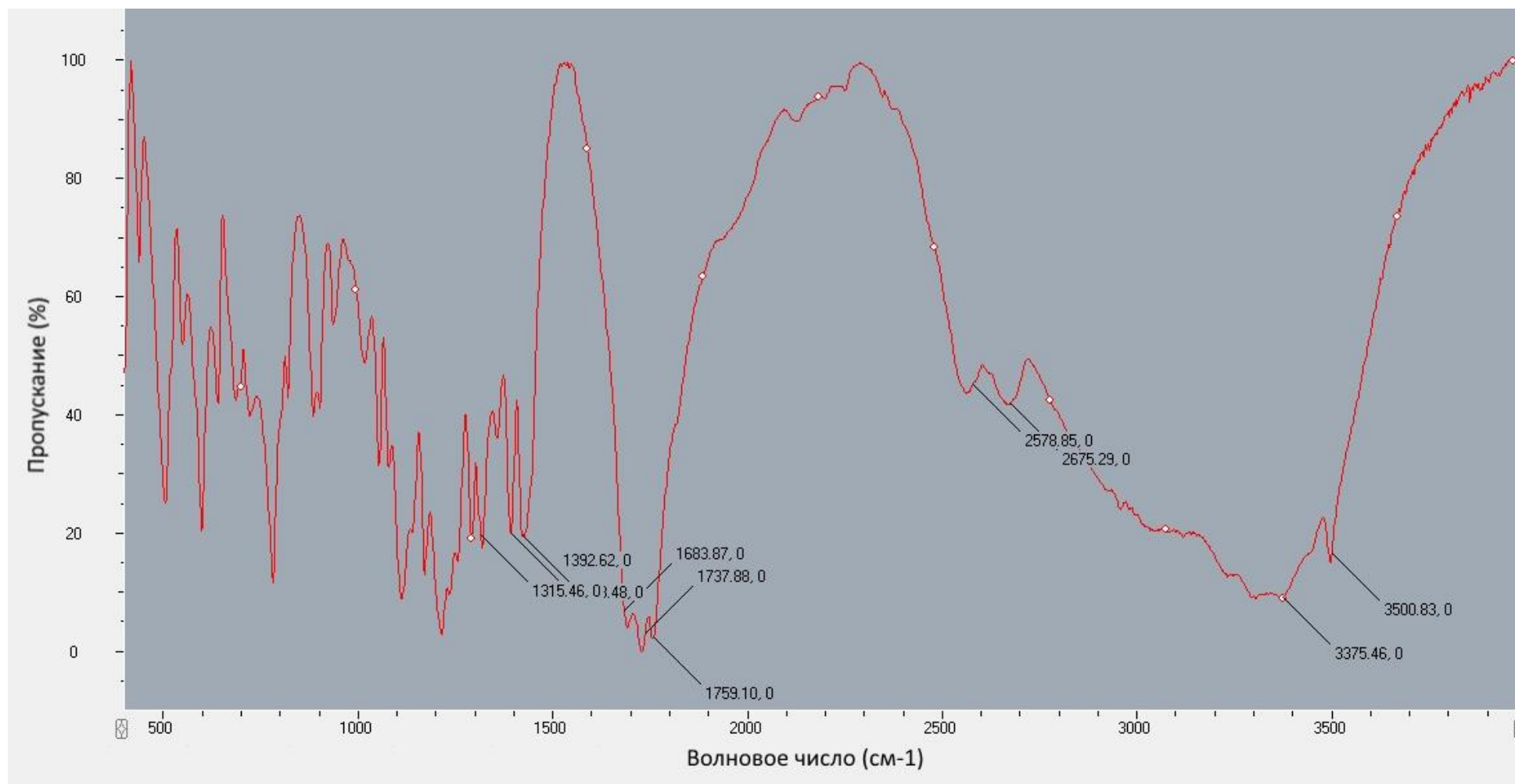


Рисунок 5. ИК-спектр цитрат-иона

2.6.2 Атомно-абсорбционная спектрометрия фрагмента германия в составе ациклогермания

Для определения фрагмента германия в составе ациклогермания был предложен метод атомно-абсорбционной спектрометрии, сочетающий относительную простоту анализа и пробоподготовки, а также высокую селективность. Испытание проводилось в соответствии с условиями, приведенными в Таблицах 8 и 9. Данные параметры могут быть воспроизведены на большинстве современных атомно-абсорбционных спектрометров.

Таблица 8. Общие условия испытания.

Линия монохроматора, нм	265.2
Автоподстройка	2.0
Напряжение ФЭУ, В	830.0
Раскачка модулятора	26.0
Длительность оценки нуля, с	250.0
Время интегрирования, с	1.5
Коэффициент расчета	4.0

Таблица 9. Стадии атомно-абсорбционного анализа.

Стадии	Длительность, с	Температура, °С	Аргон внутренний	Аргон внешний
Сушка	35.0	120	Малый	Включен
Пиролиз I	25	400	Малый	Включен
Оценка нуля	7.0	400	Выключен	Включен
Атомизация	1.5	2400	Выключен	Включен
Очистка	1.7	2500	Большой	Включен
Пауза	70	0	Большой	Включен

Растворы.

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

Были проведены испытания растворов с различной концентрацией германия (по три испытания для каждой концентрации) и на основании полученных данных построен первичный калибровочный график (см. таблицу 10, рисунок 6).

Таблица 10. Результаты анализа стандартных растворов германия.

Концентрация германия в стандартном растворе, мкг/мл	Поглощение резонансного излучения (интегр., среднее значение)
1	0.039
5	0.136
10	0.302
50	1.243
100	1.625
125	1.910
250	2.500

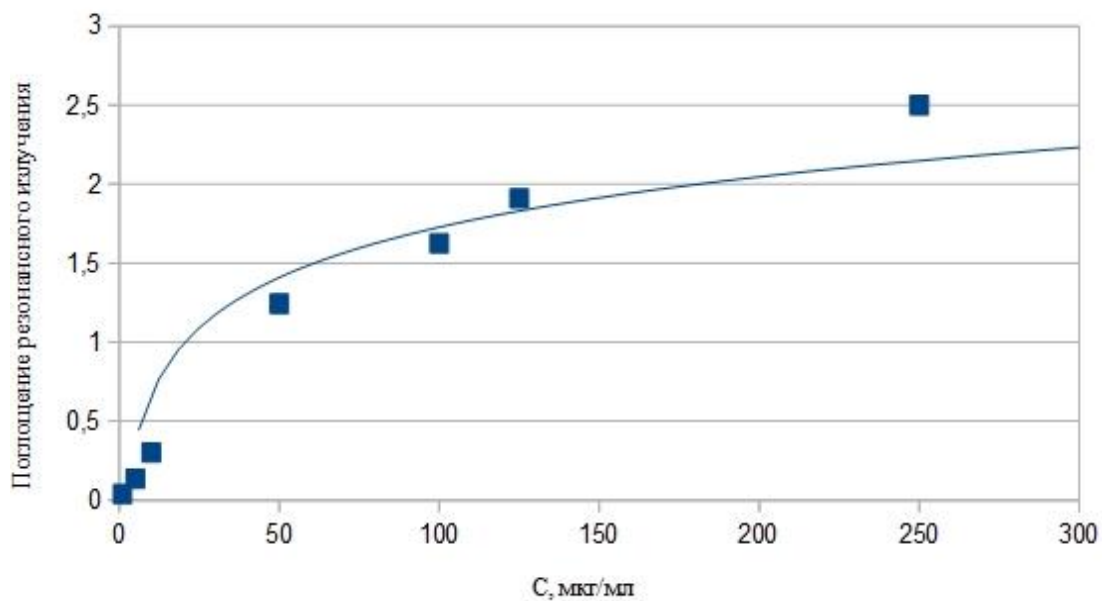


Рисунок 6. Калибровочный график, соответствующий всему исследованному диапазону концентраций.

Уравнение регрессии (логарифмическая зависимость):

$$f(x) = 0.459 \ln(x) - 0.386.$$

$$R^2 = 0.905.$$

На основании полученных данных был выделен диапазон концентраций, в котором наблюдалась линейная зависимость, от 1 до 50 мкг/мл, и построен соответствующий график (см. рисунок 7).

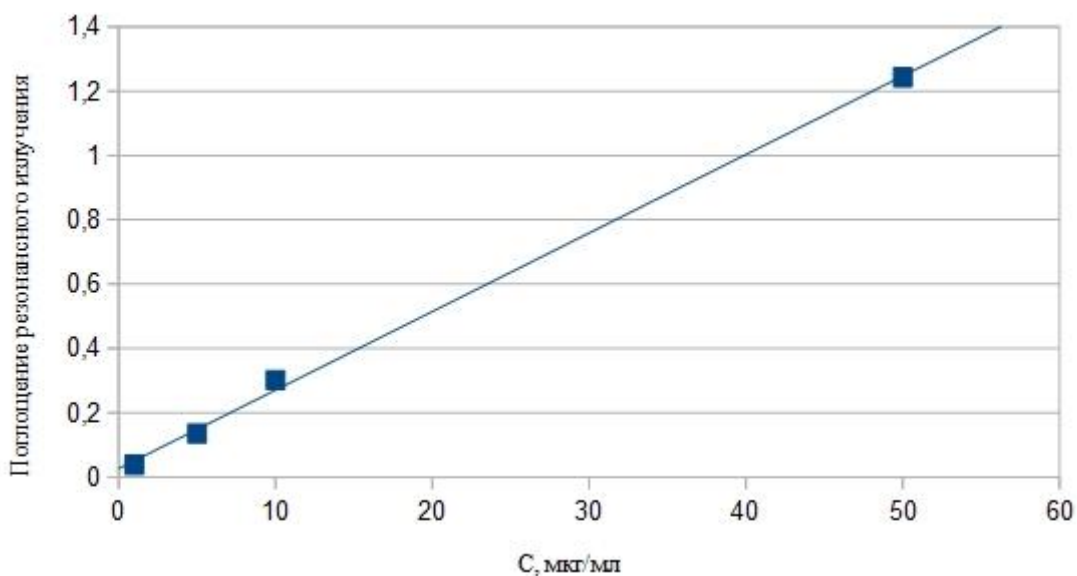


Рисунок 7. Калибровочный график, соответствующий линейному диапазону концентраций.

Уравнение регрессии (линейная зависимость):

$$f(x) = 0.024x + 0.027$$

$$R^2 = 0.998.$$

Для фармакопейной методики было предложено использовать построение калибровочного графика по трем точкам, используя диапазон концентраций стандартного раствора, обладающий наибольшей линейностью (см. рисунок 1), 1, 5 и 10 мкг/мл. Исходя из полученных данных, а также информации о строении комплексной молекулы ациклогермания, были предложены методики приготовления стандартных и испытуемых растворов, а также расчетная формула содержания германия.

Полный текст разработанной методики приведен в Приложении 1 (Нормативная документация для фармацевтической субстанции ациклогермания).

2.7 ВЭЖХ при анализе субстанции ациклогермания

2.7.1 Введение

В качестве основного метода качественного и количественного определения фрагмента ацикловира в составе субстанции ациклогермания было предложено использование ВЭЖХ с УФ-детектором, так как методики с использованием данного оборудования общепризнано (в соответствии с ведущими мировыми фармакопеями) являются методами выбора для анализа препаратов ацикловира. В результате исследования образца ациклогермания в соответствии с взятой за основу методикой из Европейской фармакопеи 8.0 была обнаружена ее недостаточная пригодность для переноса в проект НД для ациклогермания без изменений, так как:

- время удерживания ацикловира на хроматограмме образца ациклогермания и на хроматограмме стандартного раствора ацикловира значительно различалось (11 минута у ацикловира, что соответствует нормам Европейской фармакопеи, 3 минута у ациклогермания)
- коэффициент разрешения, рассчитанный для пиков основного вещества и основной примеси на хроматограмме образца ациклогермания составлял менее 1 (см. рисунки 8 и 9)

Коэффициент разрешения (R_s) рассчитывали по формуле:

$$(Формула\ 4) \quad R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{W_{h1} + W_{h2}},$$

где:

t_{R2} и t_{R1} – времена удерживания пиков, мин;

W_{h1} и W_{h2} – ширина пиков на половине высоты.

Данный результат предположительно может быть следствием значительной разницы значений рН водных растворов ацикловира, проявляющего

слабощелочные свойства, и ациклогермания, дающего кислотные значения pH. Для подтверждения данного предположения было произведено исследование образца ацикловира, разведенного раствором ортофосфорной кислоты (pH 2,1) в соотношении 1 к 10. Время удерживания пика основного вещества на хроматограмме данного образца соответствовало времени удерживания на хроматограмме ациклогермания.

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

Методика анализа ацикловира из Европейской фармакопеи является обращенно-фазной хроматографической методикой с использованием градиентного элюирования и подвижной фазы с преобладанием неорганического компонента, значение pH слабокислое (0-5 минута 100% Компонент А, далее градиент от 100 до 80% Компонента А до 27 минуты, где Компонент А – ацетонитрил/фосфатный буферный раствор с pH 3,1, 99/1, Компонент Б – ацетонитрил/фосфатный буферный раствор с pH 2,5, 50/50). Экспериментальным путем было установлено, что использование изократического режима элюирования с увеличением доли органического компонента (Компонент А/Компонент Б – 85/15) для всего анализа с первых минут приводит к невелированию недостатков методики, а именно к совпадению времени удерживания пиков основного вещества на

хроматограммах ацикловира и ациклогермания и лучшему разделению пиков ацикловира и основной примеси на пробах ациклогермания. Дальнейшее развитие методики привело к ее техническому упрощению, а именно выбору в качестве элюента более простой подвижной фазы состава буферный раствор/ацетонитрил – 94/6, что не привело к ухудшению хроматографических характеристик.

Изменение pH среды в щелочную сторону (использование фосфатного буферного раствора с pH 6,8) приводило к увеличению абсолютного времени удерживания обоих компонентов и, как следствие, общего времени анализа, что было признано нецелесообразным. Взаимная замена фосфатных буферных растворов с pH 2,5 и 3,1 не приводила к существенным изменениям результатов анализа, в конечный вариант методики был включен раствор с pH 2,5 как более традиционный для Российской фармакопеи.

В качестве неподвижной фазы была предложена колонка с основными параметрами C18, 250 мм x 4,6 мм, 5 мкм, сочетающая оптимальные свойства с широкой доступностью и распространенностью. Использование альтернативной, более короткой колонки (C18, 150 мм x 4,6 мм, 5 мкм) приводило к уменьшению времени удерживания и коэффициента разделения пиков основного вещества и основной примеси.

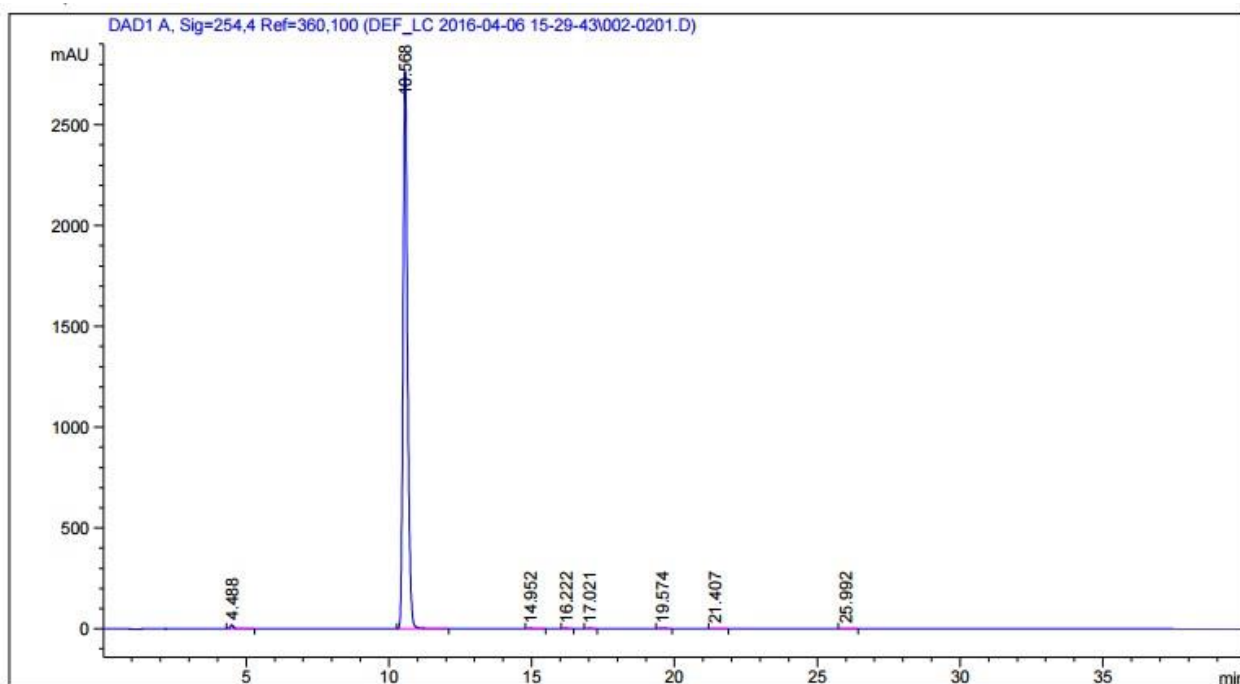


Рисунок 8. Хроматограмма стандартного образца ацикловира, снятая в соответствии с методом Европейской Фармакопеи 8.0

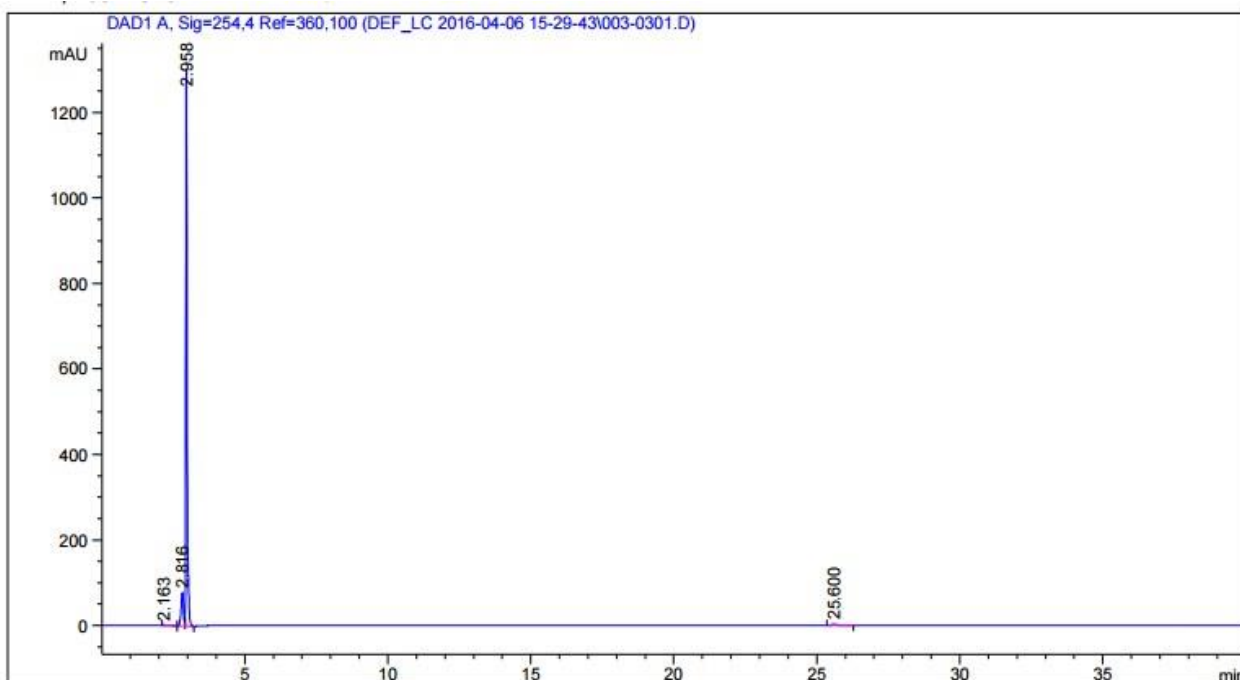


Рисунок 9. Хроматограмма образца ацилогермания, снятая в соответствии с методом Европейской Фармакопеи 8.0

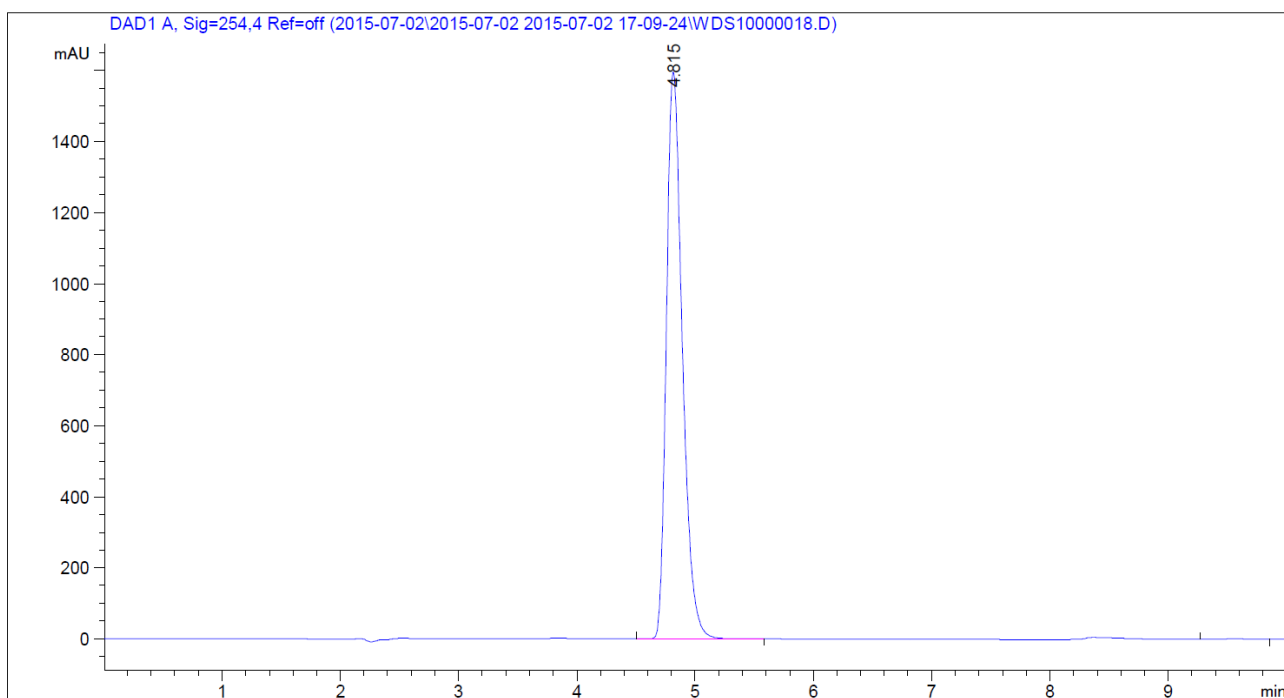


Рисунок 10. Хроматограмма стандартного образца ацикловира, снятая в соответствии с разработанной методикой

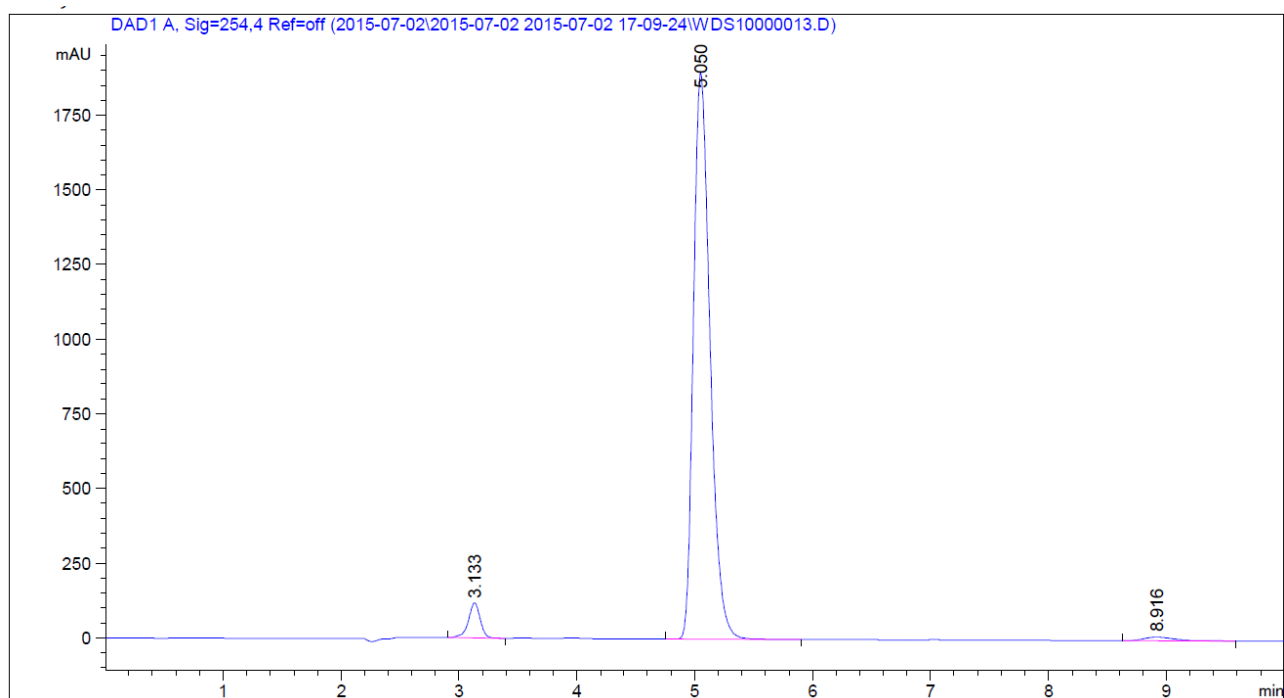


Рисунок 11. Хроматограмма образца ациклогермания, снятая в соответствии с разработанной методикой (образец ИВ-289, присутствуют пики примесей)

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

2.7.2.1 Резюме

Была проведена валидация разработанной методики количественного определения ацикловира в фармацевтической субстанции. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитический диапазон. Подтверждена пригодность разработанной методики для количественного определения ацикловира в субстанции ациклогермания. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 10 мкг/мл – 100 мкг/мл в водном растворе, что соответствует содержанию вещества 10% – 100% в исследуемом образце. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для фармакопейного анализа препаратов ациклогермания. Полный текст разработанной методики приведен в Приложении 1 (Нормативная документация для фармацевтической субстанции ациклогермания).

2.7.2.2 Растворы

Приготовление исходного стандартного раствора (100%, 1 мг/мл).

Для приготовления исходного стандартного раствора ацикловира 100 мг стандартного образца (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки водой Milli-Q, тщательно перемешивали. Конечная концентрация раствора составила 1 мг/мл ацикловира.

3. Приготовление растворов стандартов.

Конечная концентрация растворов ацикловира составила:

100 мкг/мл (10 мл стандартного раствора с концентрацией 1 мг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки водой Milli-Q, тщательно перемешивали);

75 мкг/мл (7,5 мл стандартного раствора с концентрацией 1 мг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки водой Milli-Q, тщательно перемешивали);

50 мкг/мл (5 мл стандартного раствора с концентрацией 1 мг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки водой Milli-Q, тщательно перемешивали);

25 мкг/мл (2,5 мл стандартного раствора с концентрацией 1 мг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки водой Milli-Q, тщательно перемешивали).

10 мкг/мл (1 мл стандартного раствора с концентрацией 100 мг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили до метки водой Milli-Q, тщательно перемешивали).

2.7.2.3 Специфичность

Проводили анализ стандартного раствора ацикловира с концентрацией 100 мкг/мл, растворителя, раствора плацебо раствора образца ациклогермания. В качестве раствора плацебо использовался водный раствор модельной смеси, содержащей лимонную кислоту, аргинин и германия диоксид в соотношении 4 / 1 / 1 (по массе).

Для приготовления раствора плацебо 100 мг модельной смеси (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки водой Milli-Q, тщательно перемешивали.

Для приготовления исходного стандартного раствора ацикловира 100 мг стандартного образца (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки водой Milli-Q, тщательно перемешивали. Конечная концентрация раствора составила 1 мг/мл ацикловира.

На хроматограмме растворителя и раствора плацебо отсутствовали пики с временем удерживания ацикловира. Время удерживания пиков ацикловира на хроматограммах стандартного раствора и раствора образца ациклогермания, имеющих различное значение pH, совпадало.

Method : D:\CHEM_DATA\1\DATA\2015-04-27\WDS-1 2015-04-27 15-12-44\ACICLOVIR.M (Sequence Method)
 Last changed : 4/27/2015 3:12:44 PM by SYSTEM

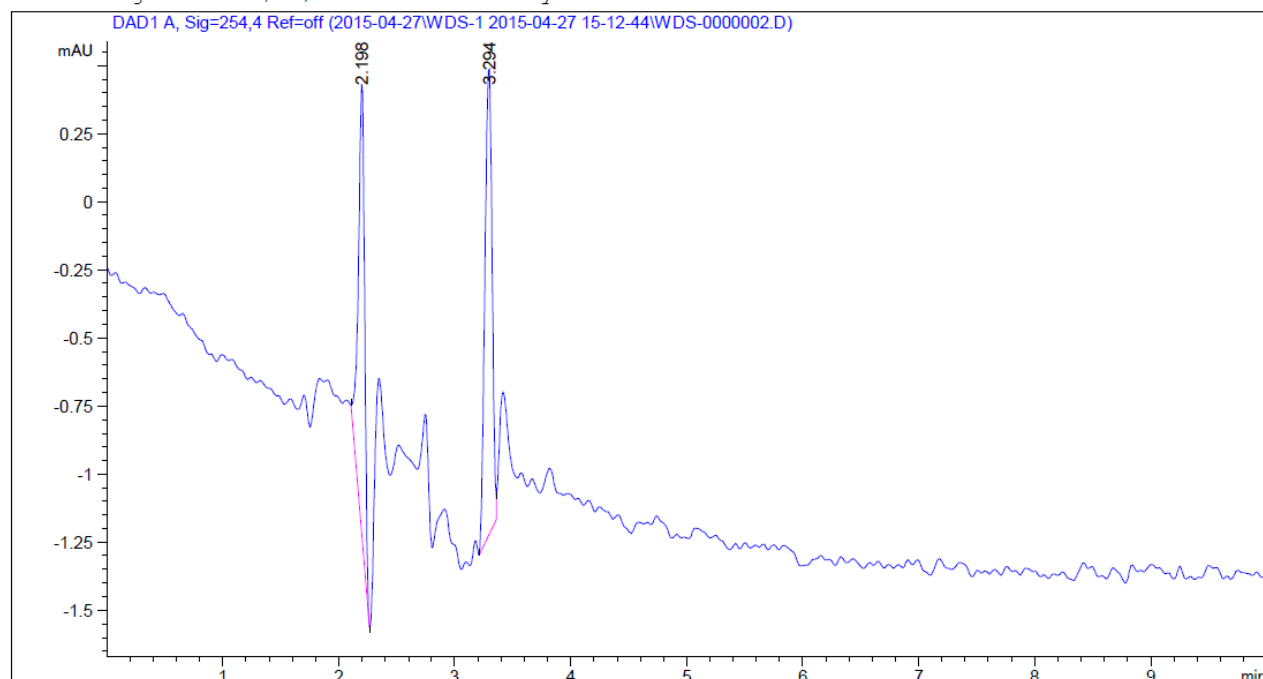


Рисунок 12. Хроматограмма раствора плацебо.

2.7.2.4 Аналитическая область и линейность

Аналитическая область методики составила 10 мкг/мл – 100 мкг/мл в водном растворе. Содержание ацикловира в субстанции ациклогермания должно быть в пределах от 16,0% до 19,0%, следовательно, данная аналитическая область соответствует критерию приемлемости (включает в себя интервал от 80% до 120% номинального содержания вещества в исследуемом образце).

Проводили анализ 5 стандартных растворов ацикловира с концентрациями, находящимися в диапазоне ожидаемых концентраций ацикловира в лекарственной форме: 10 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 75 мкг/мл, 100 мкг/мл. Данные были обработаны в соответствии с методом наименьших квадратов. По полученным значениям были построены калибровочные графики приведенные на рисунках, совместно с уравнениями калибровочных кривых и значениями коэффициентов корреляции:

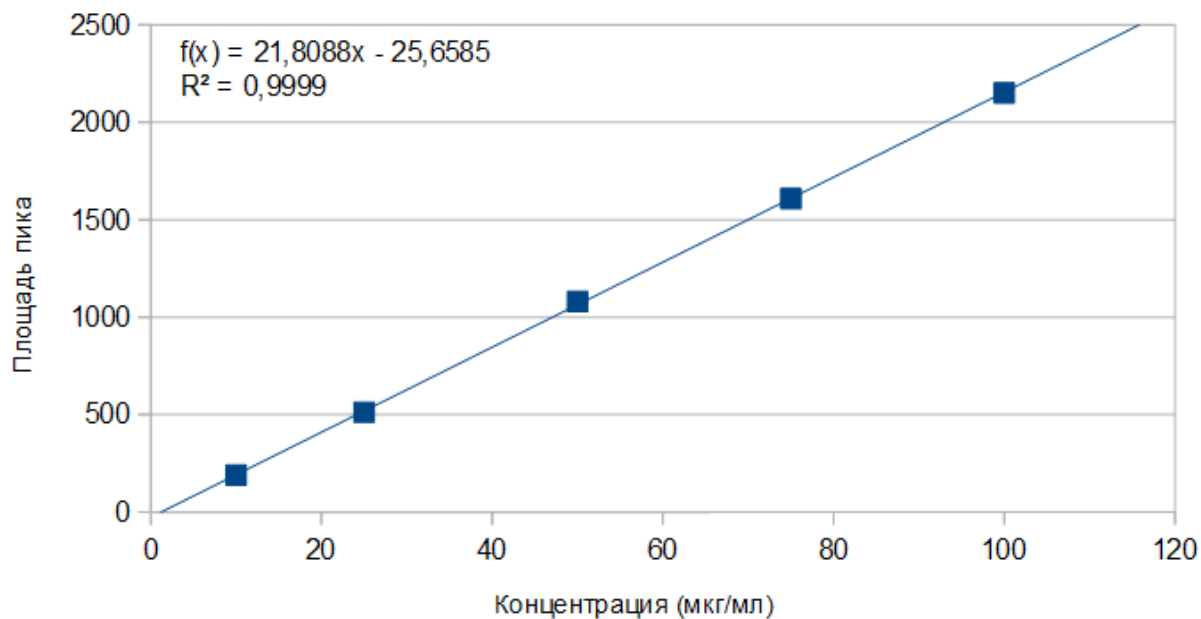


Рисунок 13. Калибровочный график №1 зависимости площади пика ацикловира от концентрации в растворе

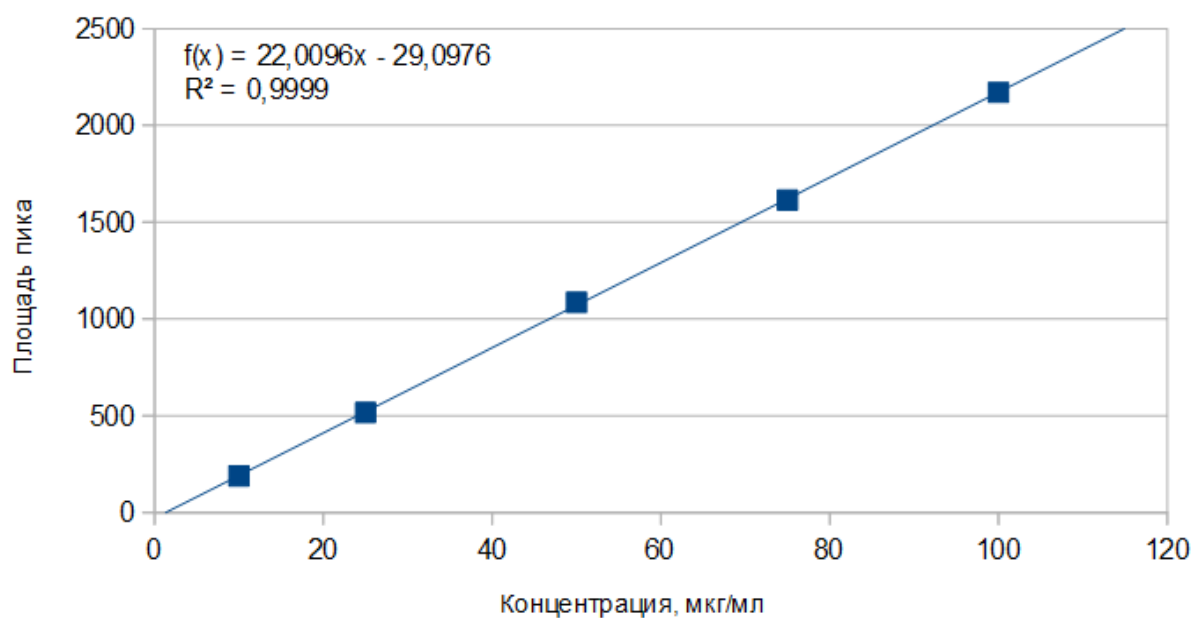


Рисунок 14. Калибровочный график №2 зависимости площади пика ацикловира от концентрации в растворе

Полученные коэффициент корреляции соответствует нормам (не менее 0,99).

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений, приведены в таблицах 4 и 5.

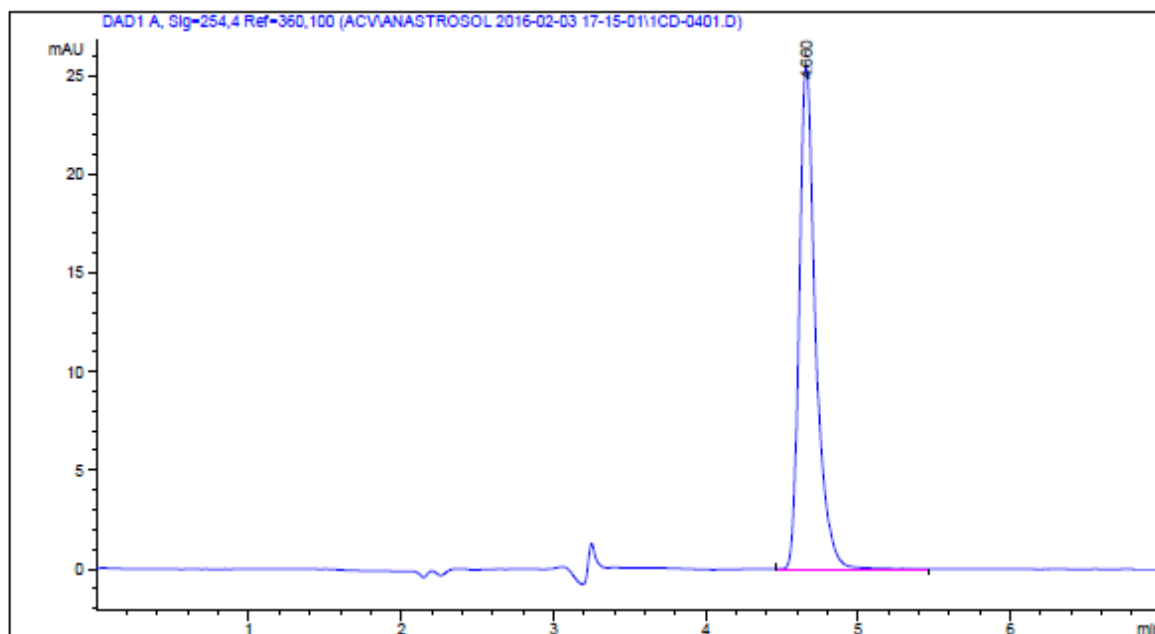
Таблица 11. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, калибровочный график №1.

Концентрация, фактическая, мкг/мл	Концентрация, рассчитанная, мкг/мл	ε, %	Норма, не более %
10	9,9	-1,3	2
25	24,7	-1,3	2
50	50,7	1,4	2
75	74,9	-0,1	2
100	99,8	-0,2	2

Таблица 12. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, калибровочный график №2.

Концентрация, фактическая, мкг/мл	Концентрация, рассчитанная, мкг/мл	ε, %	Норма, не более %
10	9,9	-1,3	2
25	24,7	-1,3	2
50	50,6	1,1	2
75	74,5	-0,7	2
100	99,7	-0,3	2

Хроматограммы стандартных растворов ацикловира приведены на рисунках:



=====
 Area Percent Report
 =====

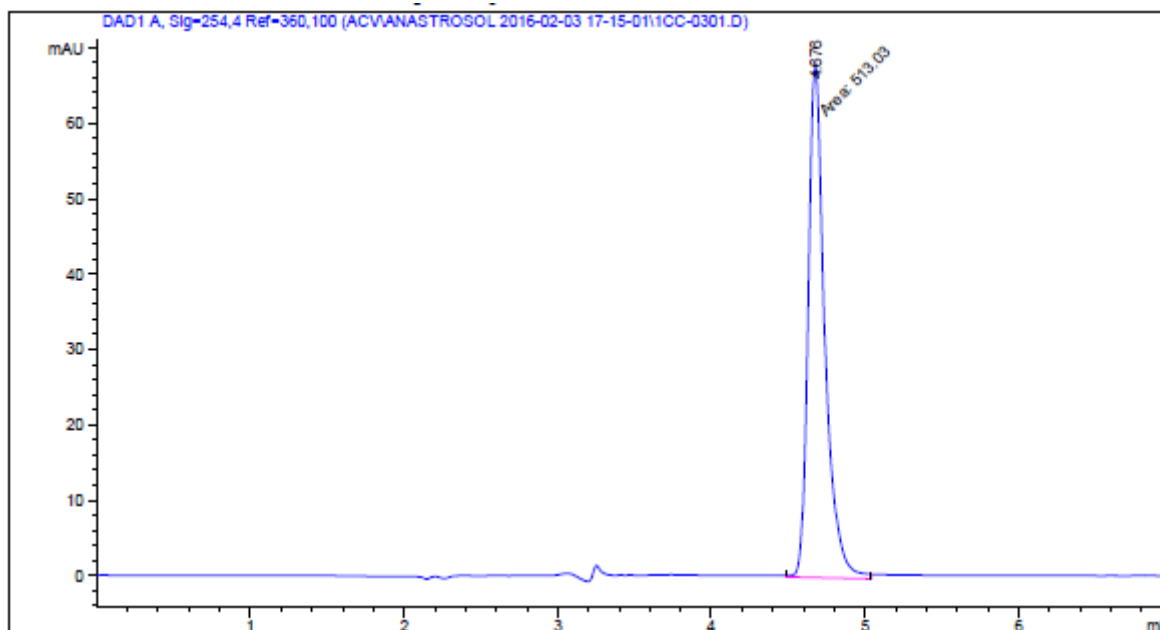
Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.660	BB	0.1110	190.17429	25.50772	100.0000

Totals : 190.17429 25.50772

Рисунок 15. Хроматограмма стандартного раствора ацикловира с концентрацией 10 мкг/мл.



```

=====
                        Area Percent Report
=====

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

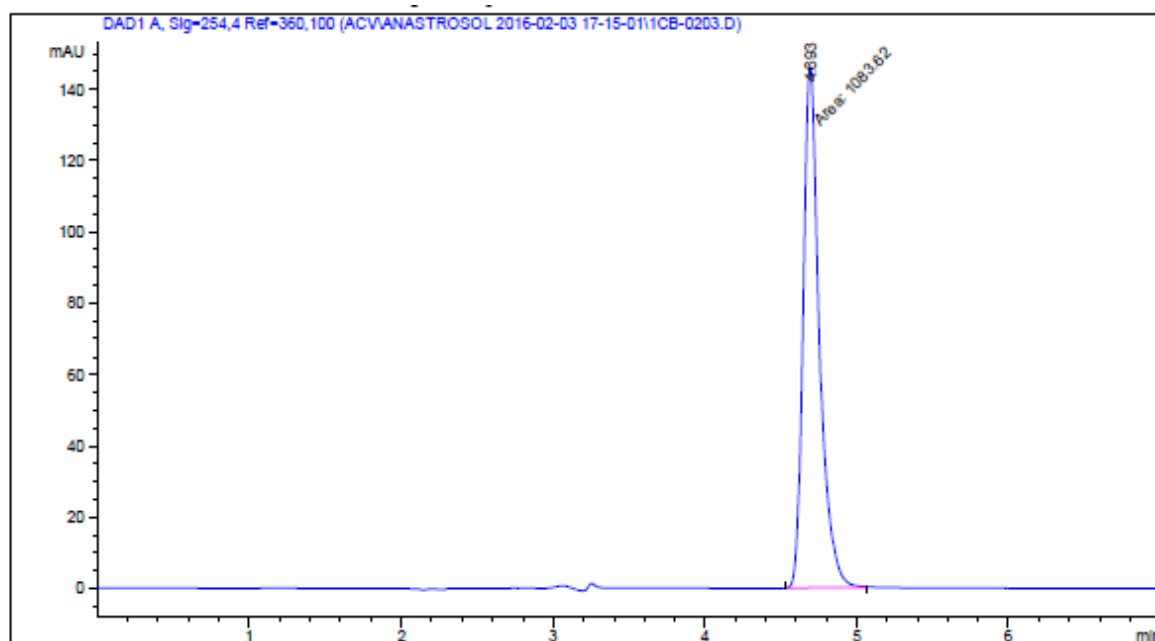
Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak RetTime Type Width Area Height Area
# [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|
1 4.676 MM 0.1259 513.02997 67.92791 100.0000

Totals :                      513.02997 67.92791

```

Рисунок 16. Хроматограмма стандартного раствора ацикловира с концентрацией 25 мкг/мл.



=====
 Area Percent Report
 =====

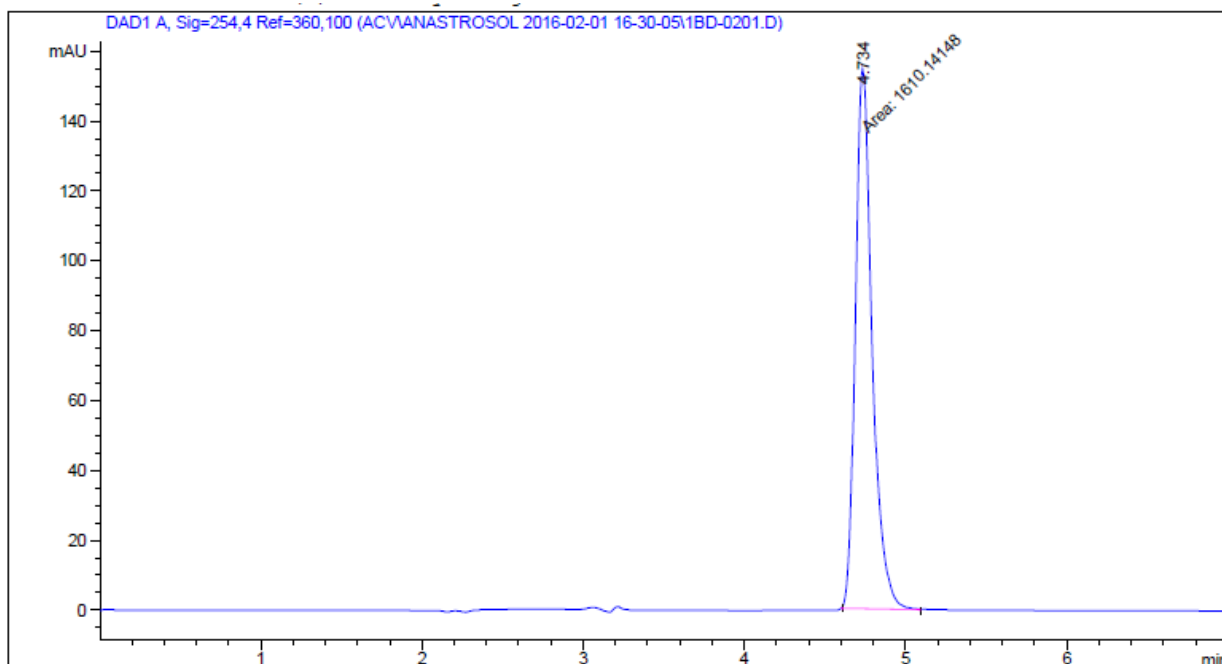
Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.693	MM	0.1236	1083.61804	146.16920	100.0000

Totals : 1083.61804 146.16920

Рисунок 17. Хроматограмма стандартного раствора ацикловира с концентрацией 50 мкг/мл



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	4.734	MM	0.1172	1610.14148	153.05077	100.0000

Totals : 1610.14148 153.05077

Рисунок 18. Хроматограмма стандартного раствора ацикловира с концентрацией 75 мкг/мл

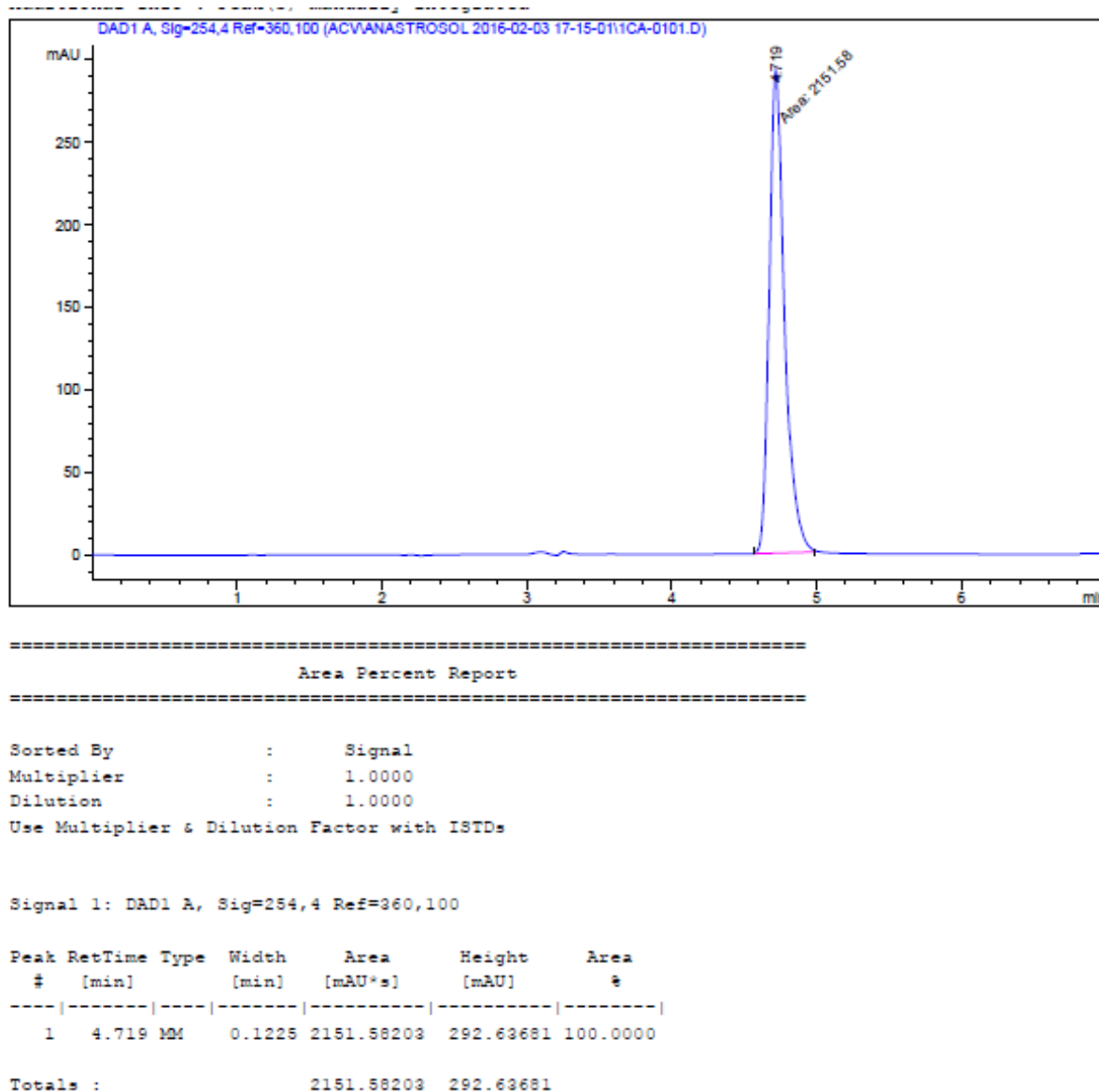


Рисунок 19. Хроматограмма стандартного раствора ацикловира с концентрацией 100 мкг/мл.

2.7.2.5 Робастность

Было проведено исследование стандартного раствора ацикловира с концентрацией 100 мкг/мл с использованием двух схожих хроматографических колонок, Agilent Eclipse XDB-C18 5x4.6x250 и Kromasil 100-5-C18 5x4.6x250. В результате исследования не было выявлено значительной разницы во времени удерживания и площади пика ацикловира (см. Рис. 20, 21).

Таблица 13. Оценка влияния замены хроматографической колонки на методику

Хроматографическая колонка	Время удерживания	Площадь пика	RSD, %
Agilent Eclipse XDB-C18	4,67	2258,95	0,76
	4,675	2228,91	
	4,679	2274,35	
Kromasil 100-5-C18	4,786	2244,48	
	4,795	2270,4	
	4,789	2246,92	

Было проведено исследование стандартного раствора ацикловира с концентрацией 100 мкг/мл с использованием компонента А подвижной фазы с контролируемым значением pH 2.4, а также с контролируемым значением pH 2.6. В результате исследования было выявлено незначительное влияние изменения pH в данном диапазоне на время удерживания ацикловира.

Таблица 14. Оценка влияния разброса значений pH компонента А подвижной фазы на методику

pH компонента А подвижной фазы	Время удерживания	Площадь пика	RSD, %
2.4	4,677	2229,03	1,83
	4,679	2289,72	
	4,669	2199,66	
2.6	4,586	2180,41	
	4,555	2237,03	
	4,519	2268,47	

Было проведено исследование стандартного раствора ацикловира с концентрацией 100 мкг/мл при температуре колонки 23 и 27. В результате исследования не было выявлено существенного влияния изменения температуры колонки в данном диапазоне на хроматографический результат исследования.

Таблица 15. Оценка влияния разброса значений pH компонента А подвижной фазы на методику

Температура хроматографической колонки	Время удерживания	Площадь пика	RSD, %
23	4,681	2267,17	1,92
	4,674	2256,73	
	4,664	2256,30	
27	4,686	2253,21	
	4,655	2162,18	
	4,619	2194,25	

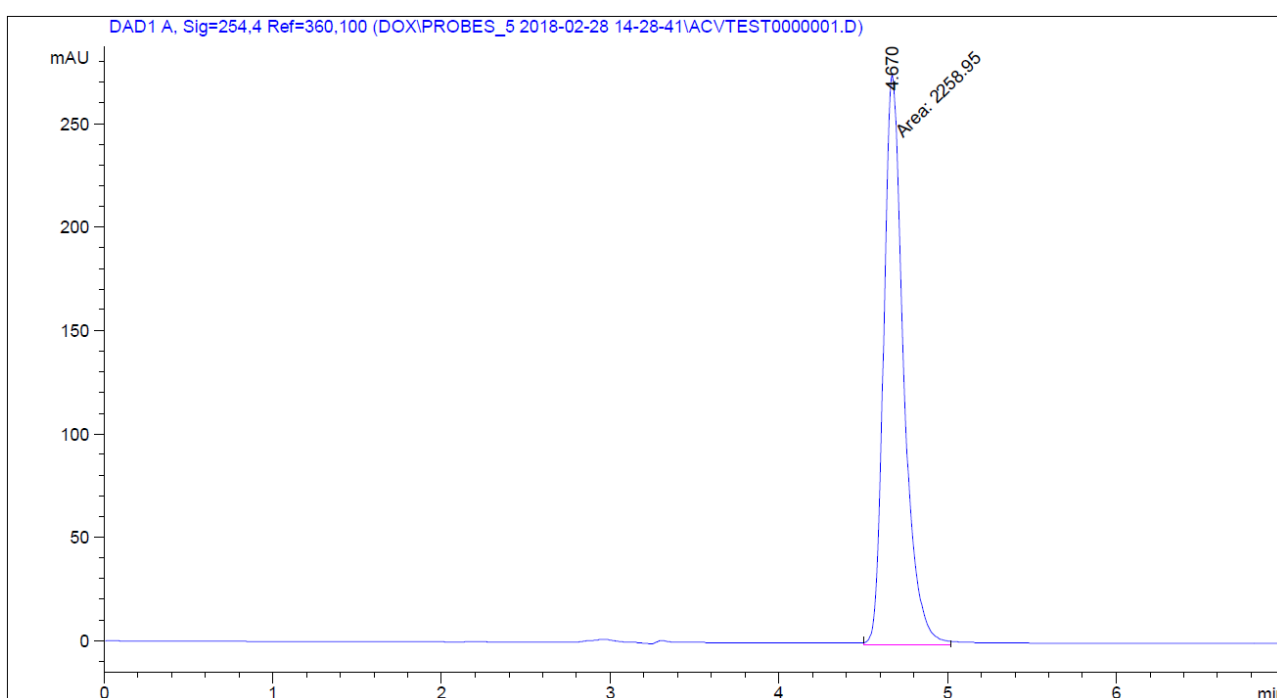


Рисунок 20. Хроматограмма стандартного раствора ацикловира с концентрацией 100 мкг/мл (колонка Agilent Eclipse XDB-C18).

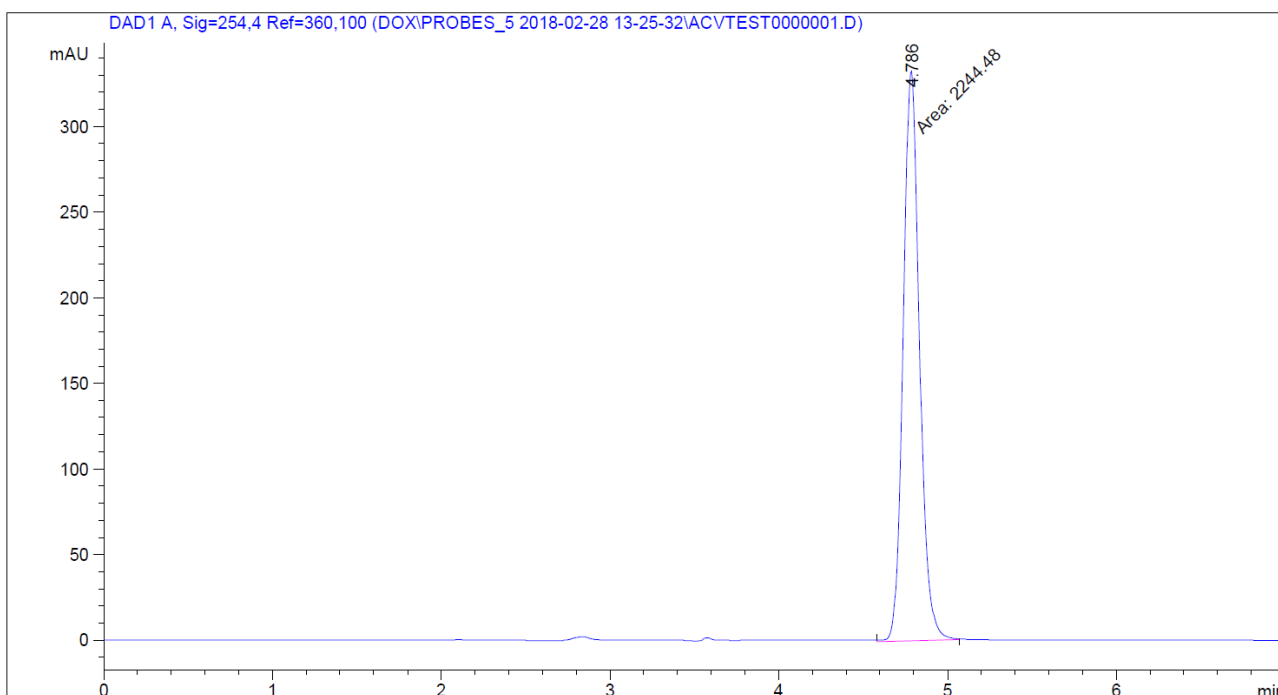


Рисунок 21. Хроматограмма стандартного раствора ацикловира с концентрацией 100 мкг/мл (колонка Kromasil 100-5-C18).

2.7.2.6 *Правильность и прецизионность*

Проводили анализ 3 образцов стандартных растворов ацикловира с концентрациями 10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл. Анализ проводили для одной последовательности из 5 вколов для каждого уровня концентраций. Прецизионность оценивали как повторяемость (сходимость). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в Таблице 16.

Таблица 16. Правильность и прецизионность методики (внутри цикла)

введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл) посл.1	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, %
10	9,95	9,93	0,06	0,61	-0,72
	10,00				
	9,90				
	9,95				
	9,84				
50	50,28	50,44	0,22	0,44	0,88
	50,56				
	50,42				
	50,19				
	50,74				
100	99,45	99,00	0,42	0,42	-1,00
	99,08				
	99,27				
	98,81				
	98,39				

Для расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %) использовались данные (n=10), полученные в течение одной последовательности (внутри цикла).

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) соответствуют нормам (не более 2%).

2.7.3 Разработка и частичная валидация методики количественного определения фрагмента ацикловира в составе ациклогермания методом ВЭЖХ с масс-селективным детектированием

2.7.3.1 Резюме

Была разработана альтернативная ВЭЖХ-методика количественного определения фрагмента ацикловира в составе ациклогермания, с использованием масс-селективного детектора с тройным квадруполем. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: правильность, прецизионность. Сделано заключение о целесообразности включения методики в проект нормативной документации.

2.7.3.2 Растворы

Приготовление стандартных растворов аналогично приготовлению стандартных растворов для методики ВЭЖХ с УФ-детектированием (пункт 2.7.2.2).

Приготовление элюента В подвижной фазы: 10 mM водного раствора формиата аммония. В мерную колбу вместимостью 1 литр помещали 0,63 г формиата аммония и растворяли в 500 мл воды Milli-Q. Далее доводили объем тем же растворителем до метки и перемешивали.

Компонент Б подвижной фазы – ацетонитрил для хроматографии.

2.7.3.3 Хроматографические условия

Колонка	Perfectsil MZ-micro2 C8 5x100x2.1
Температура колонки	25 °C
Подвижная фаза	Компонент А и Компонент Б в соотношении 30:70
Скорость потока	400 мкл/мин
Детектор	Позитивная ионизация(MRM(E+)), m/z 226,1>152,1
Объем пробы	4 мкл
Время анализа	3 мин

Хроматограмма стандартного раствора ацикловира (10 мкг/мл) приведена на рисунке:

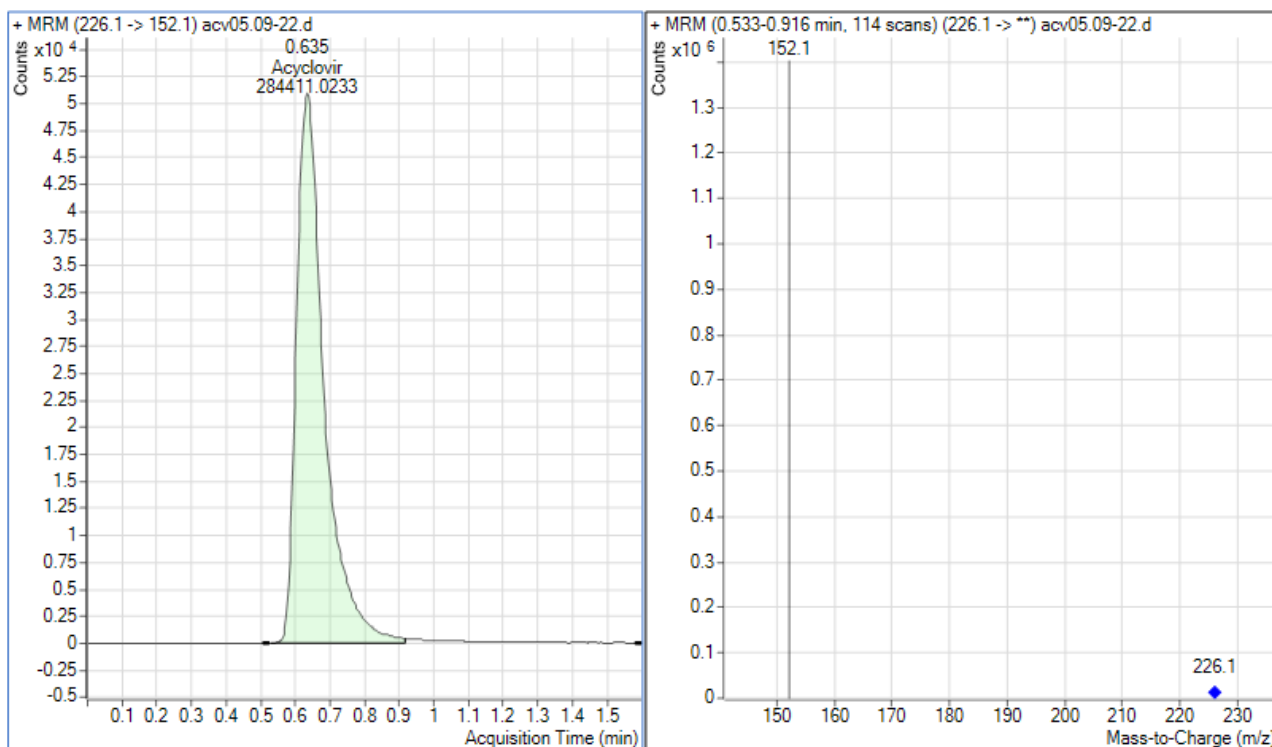


Рисунок 22. Хроматограмма стандартного раствора ацикловира с концентрацией 10 мкг/мл (МС-детектирование).

2.7.3.4 Правильность и прецизионность

Проводили анализ 3 образцов стандартных растворов ацикловира с концентрациями 10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл. Анализ проводили для 2 последовательностей по 5 вколов для каждого уровня концентраций. Исследование проводили в течение 1-ой последовательности (внутри цикла) и 2-ой последовательности (между циклов). Прецизионность оценивали как повторяемость (сходимость). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в Таблицах.

Таблица 17. Правильность и прецизионность методики (внутри цикла)

введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл) посл.1	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ε , %
10	11,87	10,92	0,86	7,84	9,24
	9,60				
	10,76				
	10,96				
	11,43				
50	53,40	53,03	1,24	2,34	6,07
	52,60				
	54,13				
	53,95				
	51,09				
100	102,42	102,97	1,98	1,92	2,97
	106,23				
	100,95				
	102,16				
	103,11				

Таблица 18. Правильность и прецизионность методики (между циклов)

введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл) посл.2	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
10	11,15	10,63	0,74	6,98	6,30
	10,21				
	9,83				
	10,57				
	9,92				
50	52,41	52,97	2,07	3,91	5,94
	53,95				
	49,8				
	51,19				
	57,2				
100	101,38	102,71	1,52	1,48	2,71
	101,96				
	104,16				
	102,34				
	102,38				

Для расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %) на уровне между циклов использовались данные (n=10), полученные в течение 1-ой последовательности (внутри цикла) и 2-ой последовательности (между циклов).

2.7.3.5 Заключение

Преимуществами разработанной методики ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием по сравнению с альтернативной методикой (ВЭЖХ с УФ-детектированием) является простота, низкая трудоемкость и сниженное время анализа, однако, низкие значения точности и прецизионности методики, не укладывающиеся в требования о не более чем 2% отклонении, не позволяют рассматривать ее в качестве основной.

2.7.4 Идентификация основной примеси ациклогермания

При проведении хроматографического анализа образцов субстанции ациклогермания было установлено наличие характерного пика примеси с временем удерживания около 3 минут, время удерживания относительно пика ацикловира около 0.75. Спектр поглощения пика примеси, снятый при помощи применяемого для хроматографического анализа УФ-детектора, в значительной степени совпадал с соответствующим спектром ацикловира. Возникла необходимость идентификации данной примеси с целью определения допустимости ее содержания (путем установления по литературным данным класса опасности для данного вещества), а также для выдвижения гипотезы относительно возможных причин появления примеси и способов их устранения.

С целью первичной идентификации примеси был предложен метод хромато-масс-спектрометрии. Для этого опыт исследования образца субстанции ациклогермания был в точности воспроизведен на жидкостном хроматографе, снабженном УФ-детектором, а также масс-селективным детектором с тройным квадруполом. В результате были получены хроматограммы образца, снятые при помощи УФ-детектора, на которых наблюдались характерные пики ацикловира и основной примеси, а также произведено масс-спектрометрическое сканирование по диапазону масс от 100 до 1000. Во временной точке, соответствующей на хроматограмме пику основной примеси, на масс-спектре

был обнаружен характеристический ион с отношением m/z около 152. В результате анализа литературных данных было выдвинуто предположение, что данный ион соответствует гуанину (рис. 1-2). Гуанин (2-амино-1Н-пурин-6(9Н)-он), молярная масса 151,13 г/моль, является одной из примесей, характерной для ацикловира, продуктом его термического разложения. Европейская фармакопея 8 издания определяет его как допустимую идентифицированную примесь (примесь В).

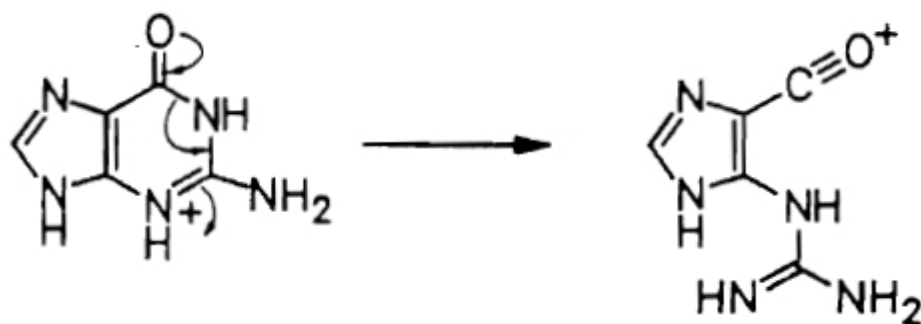


Рисунок 23. Возможная схема ионизации гуанина.

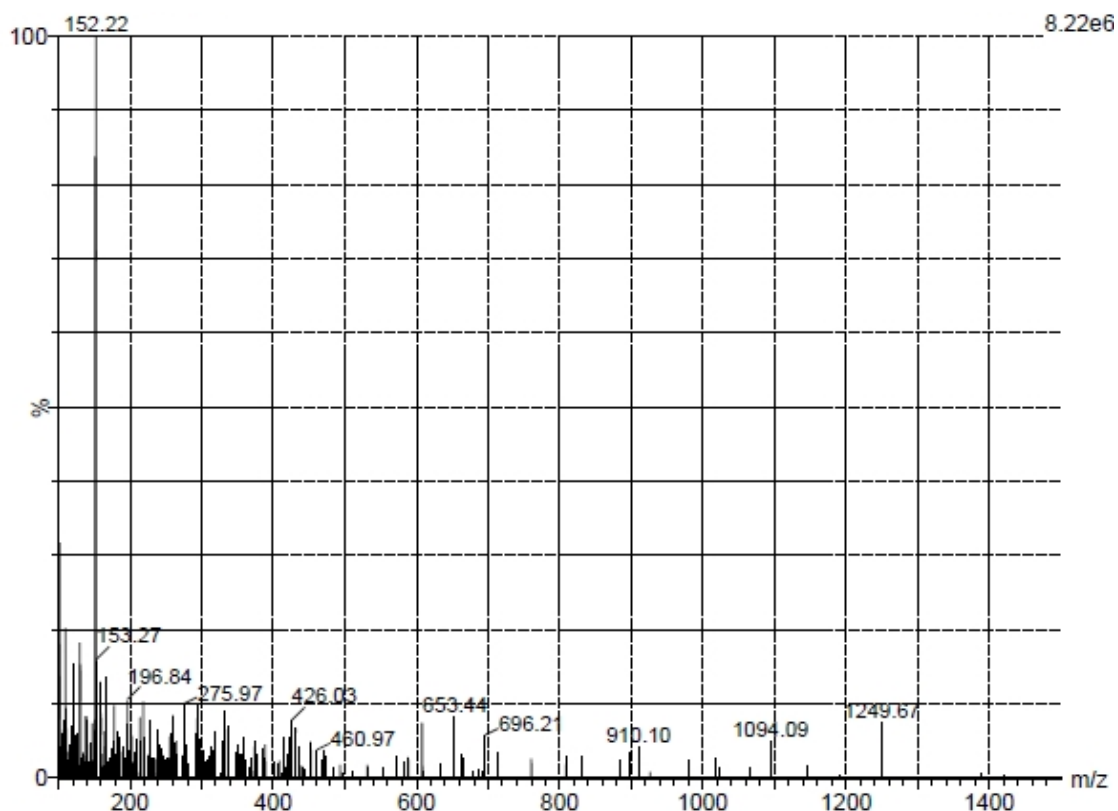


Рисунок 24. Масс-спектр субстанции ациклогермания во временной точке, соответствующей пику основной примеси (полное сканирование, вычитание фона не производилось).

С целью проверки и подтверждения произведенной идентификации примеси было проведено УФ-спектрометрическое исследование образца стандартной субстанции гуанина. Около 0,01 г субстанции гуанина (точная навеска) растворяли в 100 мл воды очищенной, подкисленной ортофосфорной кислотой до значения рН 2.0. Данное значение рН соответствует показателю рН для 1% раствора субстанции ациклогермания. Хроматографировали полученный раствор согласно методике хроматографического анализа ациклогермания.

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

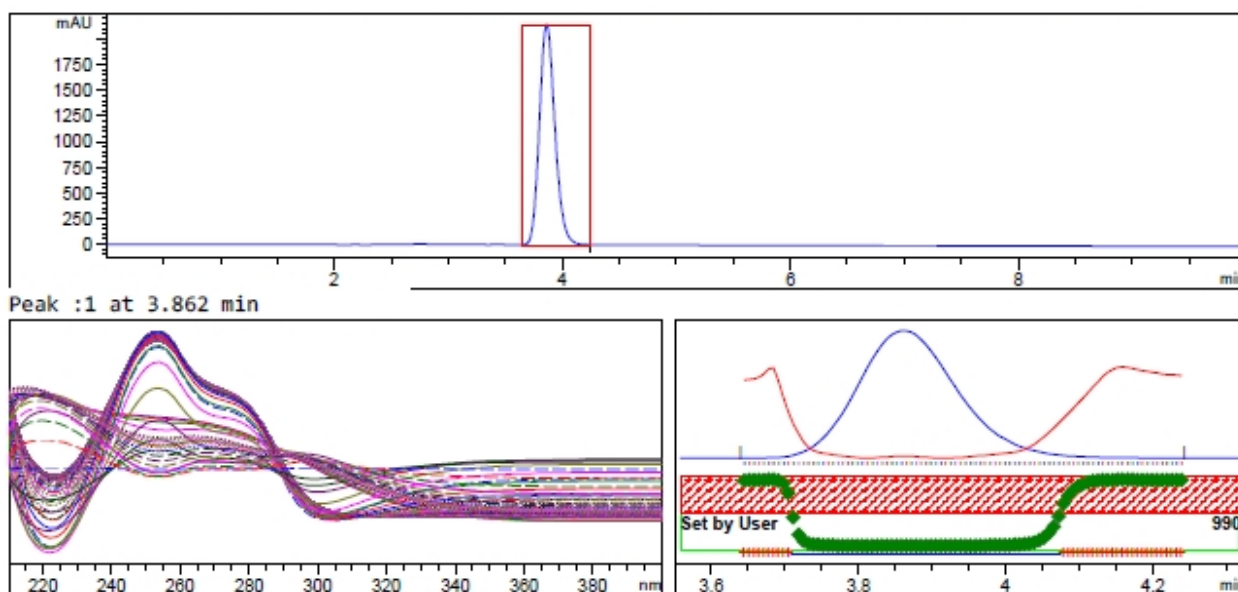


Рисунок 25. Оптический спектр основного пика на хроматограмме стандартного образца ацикловира.

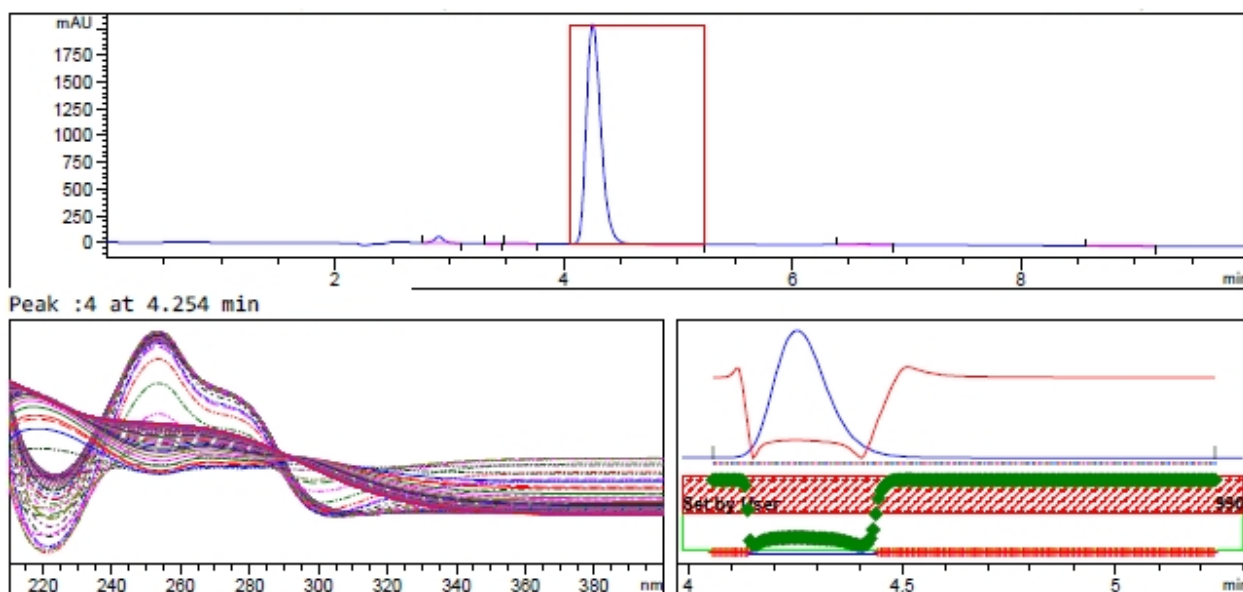


Рисунок 26. Оптический спектр основного пика на хроматограмме образца ациклогермания.

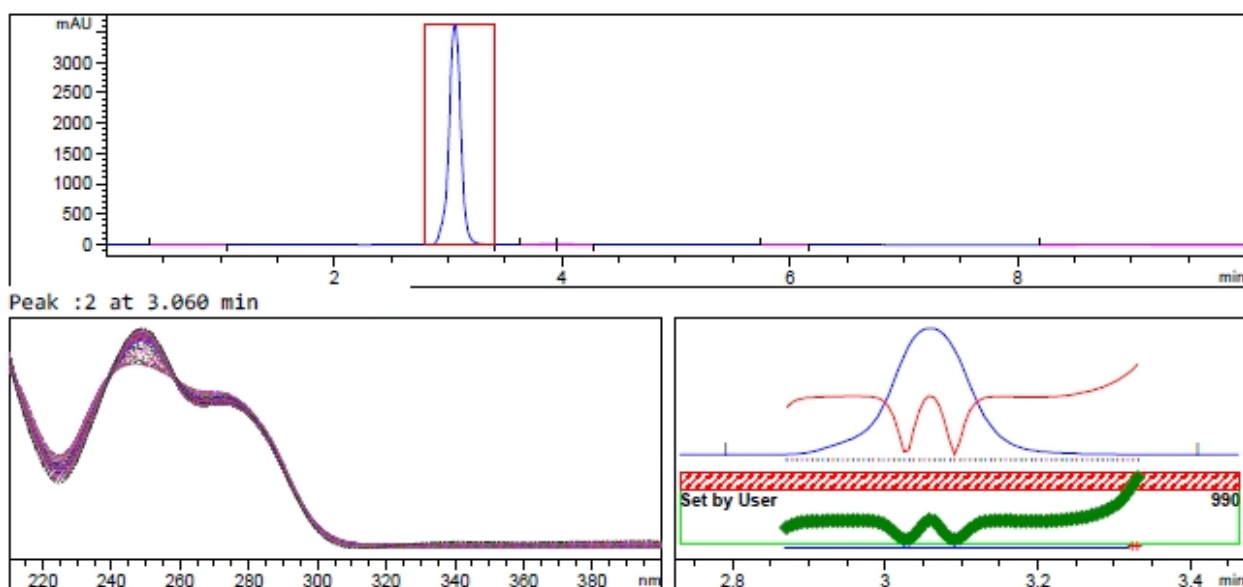


Рисунок 27. Оптический спектр основного пика на хроматограмме стандартного образца гуанина.

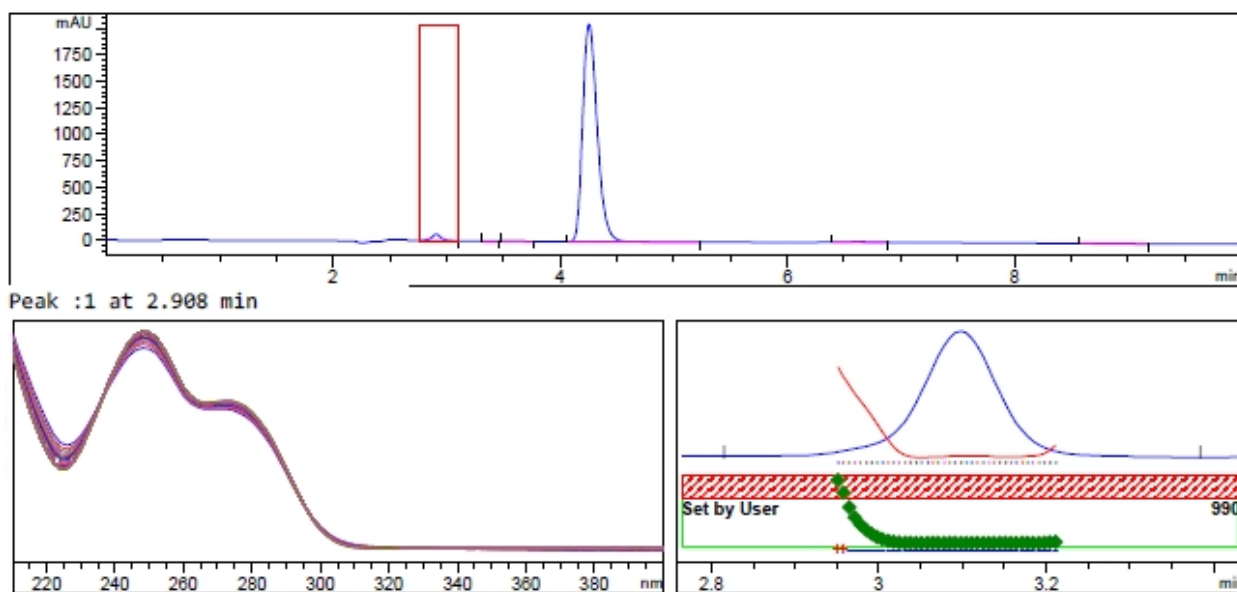
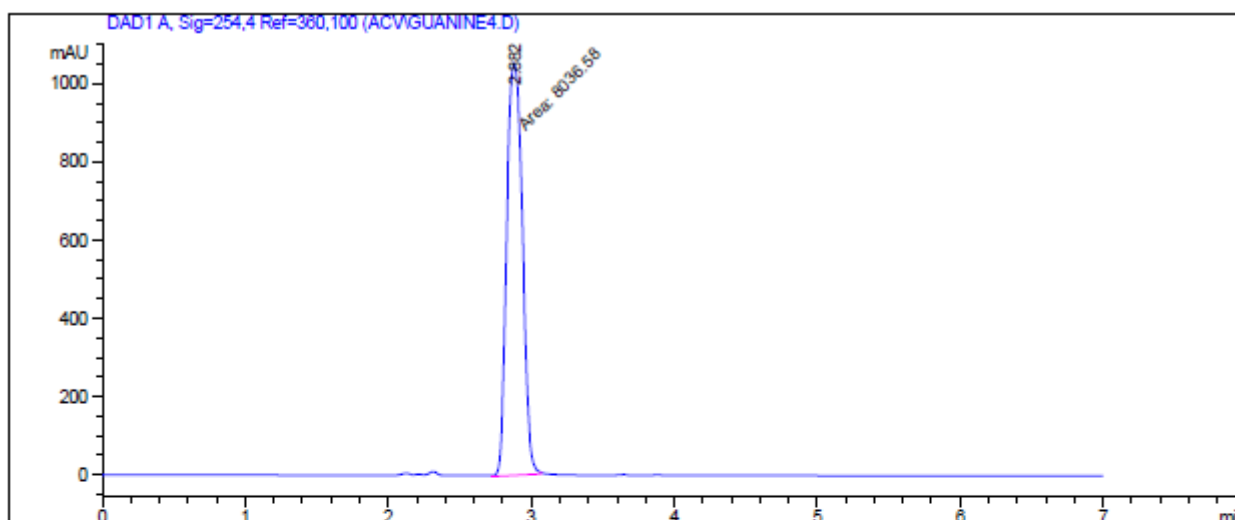


Рисунок 28. Оптический спектр пика основной примеси на хроматограмме образца ациклогермания.



```

=====
                          Area Percent Report
=====

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      10.0000
Sample Amount:      :      15.00000 [ng/ul]   (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak RetTime Type Width Area Height Area
# [min] [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1 2.882 MM 0.1272 8036.58447 1053.33789 100.0000

Totals : 8036.58447 1053.33789

```

Рисунок 29. Хроматограмма стандартного раствора гуанина

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что основная примесь, имеющая на хроматограммах образцов ациклогермания (относительное время удерживания по ацикловиру около 0,75 и абсолютное около 3 минуты), с высокой вероятностью может являться гуанином, или же крайне близким к нему соединением [3] (Алешин С.В Разработка методики определения фрагмента ацикловира в составе инновационного лекарственного препарата ациклогерманий методом ВЭЖХ. Идентификация основной примеси / С.В. Алешин [и др.] // Сорбционные И Хроматографические Процессы. – 2016. – № 1(16). – С. 93–99).

2.7.5 Валидация методики количественного определения гуанина в субстанции ациклогермания методом ВЭЖХ с УФ-детектированием

2.7.5.1 Резюме

Была проведена валидация методики количественного определения гуанина в фармацевтической субстанции, при хроматографических условиях, аналогичных условиям ранее разработанной и валидированной методики определения ацикловира. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность. Использование в качестве растворителя для стандартного образца гуанина подвижной фазы, а не воды очищенной, обусловлено физико-химическими свойствами вещества (крайне низкой растворимостью в водной среде с нейтральным значением pH). Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 2 мкг/мл – 20 мкг/мл в водном растворе. Полученные данные подтверждают пригодность методики для количественной оценке содержания гуанина в составе ациклогермания.

2.7.5.2 Растворы

Приготовление исходного стандартного раствора (200 мкг/мл).

Для приготовления исходного стандартного раствора гуанина 20 мг стандартного образца (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки подвижной фазой, тщательно перемешивали до полного растворения образца. Конечная концентрация раствора составила 200 мкг/мл гуанина.

3. Приготовление растворов стандартов.

Конечная концентрация растворов гуанина составила:

20 мкг/мл (1 мл стандартного раствора с концентрацией 200 мкг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили до метки подвижной фазой, тщательно перемешивали)

10 мкг/мл (5 мл стандартного раствора с концентрацией 20 мкг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили до метки подвижной фазой, тщательно перемешивали);

5 мкг/мл (2,5 мл стандартного раствора с концентрацией 20 мкг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили до метки подвижной фазой, тщательно перемешивали);

2 мкг/мл (1 мл стандартного раствора с концентрацией 20 мкг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки подвижной фазой, тщательно перемешивали)

1 мкг/мл (0,5 мл стандартного раствора с концентрацией 20 мкг/мл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки подвижной фазой, тщательно перемешивали).

Проводили анализ стандартного раствора гуанина с концентрацией 20 мкг/мл, растворителя, раствора образца ациклогермания. На хроматограмме растворителя отсутствовали пики с временем удерживания гуанина.

2.7.5.3 Специфичность

Было проведено исследование Модельной смеси 1, представляющей собой смесь лимонной кислоты, аргинина, ацикловира, германия диоксида и гуанина в соотношении 4 / 1 / 1 / 1 / 0,1 (по массе), Модельной смеси 2 представляющей собой смесь лимонной кислоты, аргинина, германия диоксида в соотношении 4 / 1 / 1 (по массе), образца ациклогермания, содержащего значительное количество примеси гуанина (Образец WDS-1 от 07.04 №4, см. Таблицу 19).

Времена удерживания пиков ацикловира и гуанина на хроматограммах Модельной смеси 1 и ациклогермания совпадали. На хроматограмме Модельной смеси 2 сигнал отсутствовал. Коэффициент разрешения пиков ацикловира и ациклогермания, рассчитанный по Формуле 4, составил 3,16.

2.7.5.4 Предел количественного определения

Предел количественного определения методики был оценен по соотношению сигнал/шум. Было произведено исследование стандартных растворов гуанина с концентрациями 1 мкг/мл и 2 мкг/мл.

Минимальная концентрация гуанина в образце, при которой величина отношения аналитического сигнала к уровню шума составляет около 10:1 была определена как 1 мкг/мл.

2.7.5.5 Аналитическая область и линейность

Аналитическая область методики составила 1 мкг/мл – 20 мкг/мл в водном растворе, что соответствует содержанию гуанина 0,1 – 2% в субстанции ациклогермания (предельно допустимое содержание гуанина в субстанции ациклогермания, определенное в результате изучения технических образцов субстанции, составляет 0,5%, см. Таблица 19, 21). Проводили анализ 5 стандартных растворов гуанина с концентрациями 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 4 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики, приведенные на рисунках совместно с уравнениями калибровочных кривых.

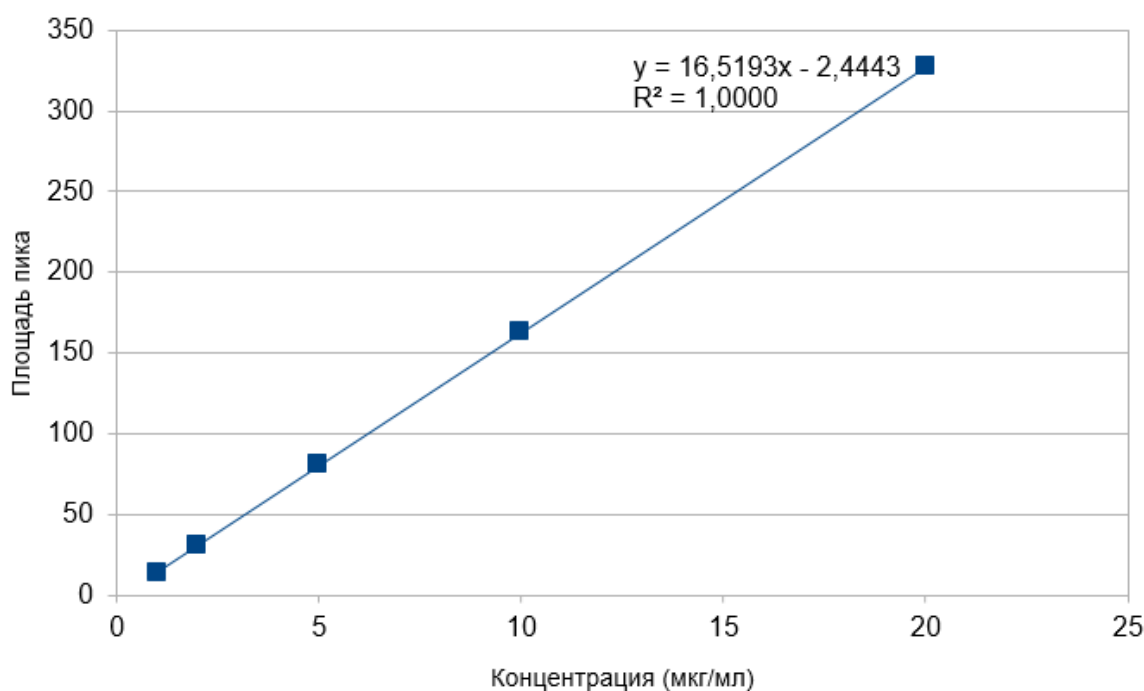


Рисунок 30. Калибровочный график №1 зависимости площади пика гуанина от концентрации в растворе

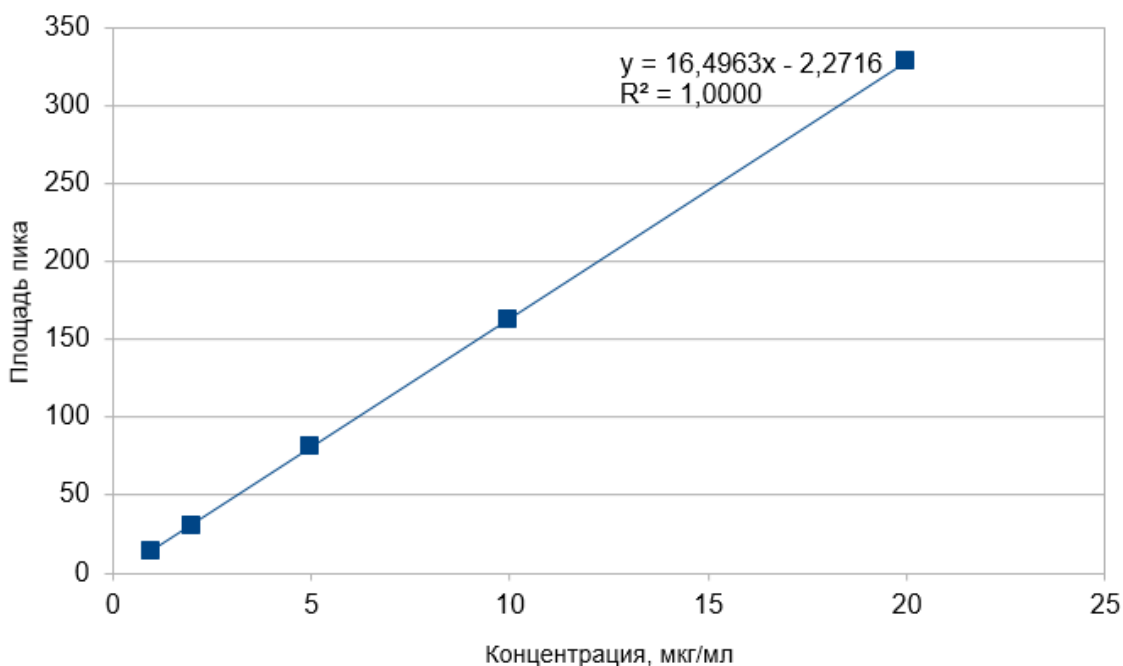


Рисунок 31. Калибровочный график №2 зависимости площади пика гуанина от концентрации в растворе

Полученные коэффициент корреляции соответствует нормам (не менее 0,99).

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений, приведены в таблицах 16 и 17.

Таблица 19. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, калибровочный график №1.

Концентрация, фактическая, мкг/мл	Концентрация, рассчитанная, мкг/мл	ε , %	Норма, не более %
1	0,98	-2,0	2
2	1,96	-1,9	2
5	5,06	1,2	2

10	10,01	0,1	2
20	19,99	-0,1	2

Таблица 20. Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, калибровочный график №2.

Концентрация, фактическая, мкг/мл	Концентрация, рассчитанная, мкг/мл	ε, %	Норма, не более %
1	0,98	-2,0	
2	1,97	-1,9	2
5	5,07	1,4	2
10	9,99	-0,1	2
20	20,0	0	2

2.7.5.6 Правильность и прецизионность

Проводили анализ 3 образцов стандартных растворов гуанина с концентрациями 20 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2 мкг/мл. Анализ проводили для последовательности по 5 вколов для каждого уровня концентраций. Прецизионность оценивали как повторяемость (сходимость) и промежуточную прецизионность. Анализ проводили для двух последовательностей по 5 вколов для каждого уровня концентраций. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в таблицах:

Таблица 21. Правильность и прецизионность методики (внутри цикла)

введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл) посл.1	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ϵ , %
2	2,03	2,01	0,03	1,30	0,30
	2,03				
	2,01				
	1,97				
	1,99				
5	4,95	4,96	0,04	0,83	-0,87
	5,02				
	4,98				
	4,90				
	4,93				
20	20,32	20,21	0,19	0,93	1,06
	20,28				
	20,14				
	20,40				
	19,92				

Таблица 22. Правильность и прецизионность методики (между циклов)

введено (мкг/мл)	найдено (мкг/мл) посл.2	найдено (мкг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
2	2,02	2,01	0,03	1,30	0,40
	1,97				
	1,99				
	2,04				
	2,03				
4	4,08	4,04	0,06	1,47	0,00
	4,06				
	3,94				
	4,04				
	4,06				
20	19,98	20,18	0,17	0,82	0,98
	20,10				
	20,38				
	20,30				
	20,14				

Для расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %) на уровне между циклов использовались данные (n=10), полученные в течение 1-ой последовательности (внутри цикла) и 2-ой последовательности (между циклов).

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) соответствуют нормам (не более 2%).

2.7.6 ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием при анализе ациклогермания.

В результате масс-спектрометрического исследования образцов ациклогермания был определен наиболее интенсивный m/z -переход для определяемой примеси, $152.1 > 110.0$, что согласно литературным данным, является наиболее характерным значением для гуанина [107]. Было проведено исследование стандартного образца гуанина, а также образца ациклогермания при хроматографических условиях, аналогичных методу ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием для количественного определения ацикловира (пункт 2.4.3). Растворы были приготовлены в соответствии с методикой, описанной в пункте 2.4.5.

Метод показал высокую чувствительность и селективность, что позволяет потенциально использовать его в качестве альтернативного метода количественной оценки содержания примеси гуанина в субстанции и лекарственных формах ациклогермания.

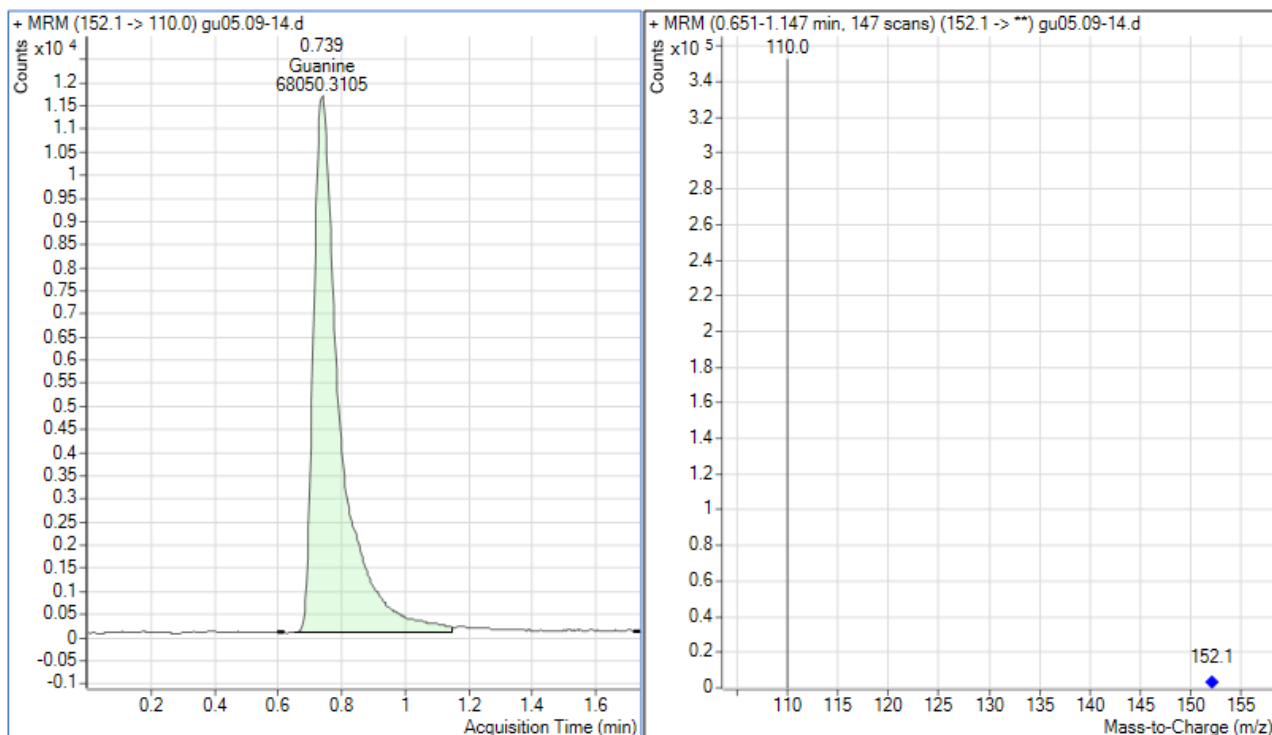


Рисунок 32. Хроматограмма стандартного раствора гуанина с концентрацией 2 мкг/мл (МС-детектирование).

2.8 Применение химических реакций для определения подлинности ациклогермания.

С целью подтверждения наличия в составе субстанции ациклогермания фрагмента аргинина и цитрат-иона было предложено использование качественных химических реакций. Использование более сложных и дорогостоящих инструментальных методов было признано нецелесообразным по причине вспомогательного характера аргинина и цитрат-иона в изучаемом комплексном соединении.

Реакция аргинина с α -нафтолом в присутствии окислителя (реакция Сакагучи) была открыта в 1925 году и впоследствии включена в огромное число нормативных документов, в том числе ГФ 10. Аналитическим результатом реакции является появление интенсивного красно-оранжевого

окрашивания. Реакция Сакагучи является в значительной степени специфичной, так как для других образующиеся в результате схожих реакций соединений (различных производных нафтохинона, в которых водород аминогруппы замещен на алкильный или арильный радикал) характерным является желтое окрашивание. Реакция Сакагучи может быть использована в том числе и для количественной оценки содержания аргинина, в определенном диапазоне концентраций достоверно коррелируя с данными ВЭЖХ-анализа. Методика реакции приведена в Приложении («Нормативная документация для субстанции ациклогермания»).

Возможный механизм реакции Сакагучи приведен на рисунке:

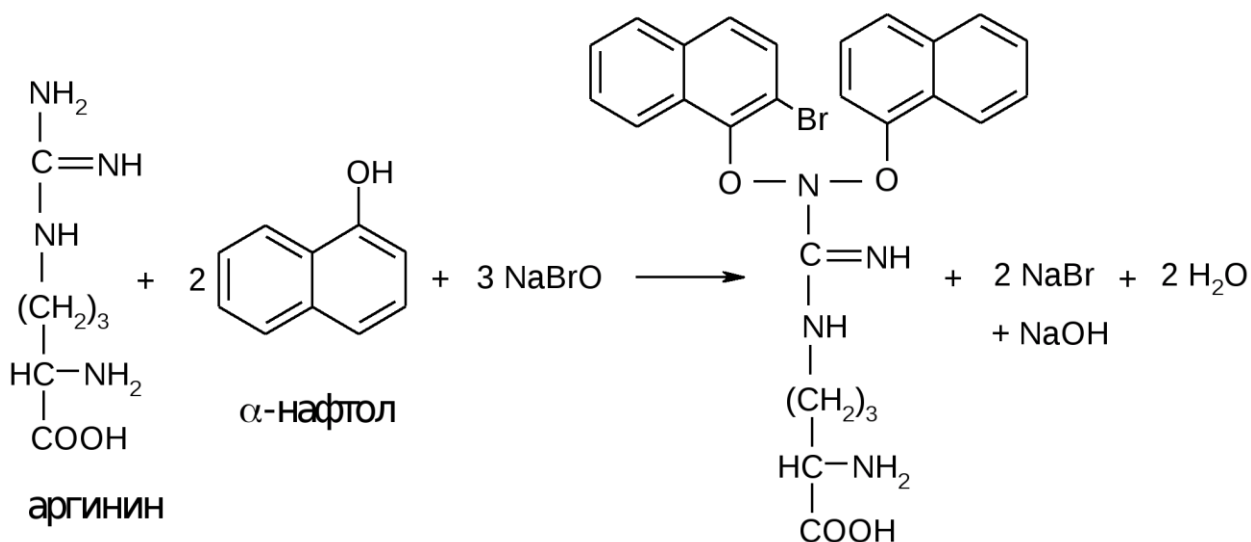


Рисунок 33. Механизм реакции Сакагучи

Была произведена оценка специфичности методики. Три независимых образца субстанции ациклогермания при анализе при помощи данной методики показали образование красно-оранжевого осадка. При параллельном анализе модельной смеси, состоящей из ацикловира, германия диоксида и лимонной кислоты в соотношении 1 : 1 : 2, раствор оставался бесцветным.

В качестве качественной реакции для обнаружения цитрат-иона была предложена реакция осаждения хлоридом кальция, являющаяся традиционной для данного соединения. Аналитическим результатом реакции является

образование белого осадка, которое происходит при кипячении раствора, так как при комнатной температуре цитрат кальция растворим в воде. В проект нормативной документации включена методика, основанная на ГФ XI (глава «Общие реакции на подлинность», раздел «Цитраты»). Методика реакции приведена в Приложении («Нормативная документация для субстанции ациклогермания»). Механизм реакции представлен на рисунке:

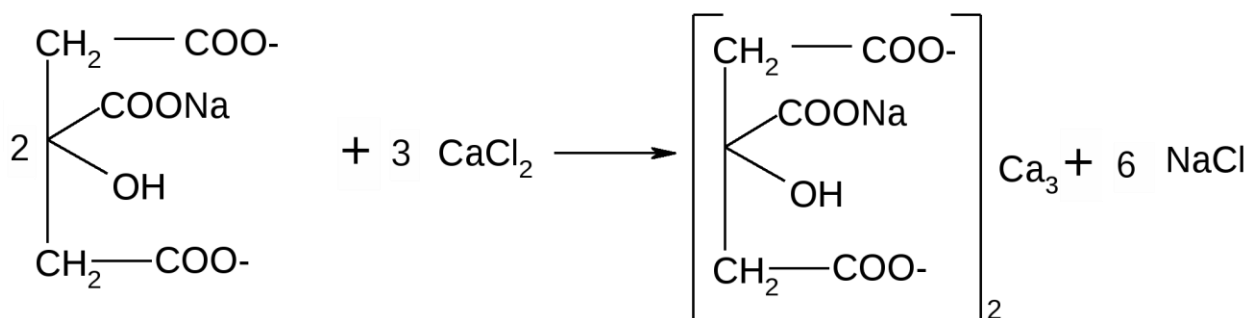


Рисунок 34. Механизм реакции хлорида кальция с цитрат-ионом

Была произведена оценка специфичности методики. Три независимых образца субстанции ациклогермания при анализе при помощи данной методики показали выпадение осадка при кипячении. При параллельном анализе модельной смеси, состоящей из ацикловира, германия диоксида и аргинина в соотношении 1 : 1 : 1, раствор оставался бесцветным.

2.9 Выводы к Главе 2.

Произведено определение физических и физико-химических свойств субстанции ациклогермания, определение ее ИК-, ААС-, УФ-, а также масс-спектров ее компонентов, ее хроматографической подвижности. Произведены исследования, позволяющие произвести разработку проекта нормативной документации для фармацевтической субстанции ациклогермания.

ГЛАВА 3. УСТАНОВЛЕНИЕ НОРМ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ОБРАЗЦОВ СУБСТАНЦИИ АЦИКЛОГЕРМАНИЯ

Установление норм качества лабораторных образцов ациклогермания производилось с целью валидации технологии получения субстанции и разработки проекта нормативной документации.

Качество лабораторных образцов ациклогермания оценивалось по следующим показателям: внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность, pH водного раствора, неидентифицированные примеси, содержание примеси гуанина, количественное содержание германия, количественное содержание ацикловира.

Анализ производили по разработанным методикам (см. Приложение 1). На основании полученных данных был подготовлен проект нормативной документации для субстанции ациклогермания (Приложение 1).

Таблица 23. Перечень изученных образцов субстанции ациклогермания.

№	Код образца субстанции	Содержание ацикловира, %	Содержание основной примеси (гуанина) относительно ацикловира, %)	Содержание основной примеси (гуанина), %	Дата начала анализа
1	WDS -1 (1)	9,6	NA	NA	6.10.14
2	WDS -1 (2)	10,1	NA	NA	6.10.14
3	WDS -1 (1)	9,7	NA	NA	6.10.14
4	WDS-1 от 07.04 №1	17,04	2,09	0,48	27.04.15
5	WDS-1 от 07.04 №2	16,09	2,87	0,65	27.04.15
6	WDS-1 от 07.04 №3	16,25	1,75	0,40	27.04.15
7	WDS-1 от 07.04 №4	16,92	3,94	0,90	27.04.15

8	WDS-1 (роторная сушка)	13,91	8,52	1,94	27.04.15
9	ИБ-220	1,44	0,12	NA	12.12.14
10	ИБ-221	2,15	0,11	NA	12.12.14
11	ИБ-223	1,34	0,18	NA	12.12.14

Таблица 24. Перечень изученных образцов промежуточных продуктов синтеза ациклогермания

№	Кодирование	Содержание основной примеси (гуанина) относительно ацикловира, %	Содержание основной примеси (гуанина), %	Дата анализа
1	ИБ-301	100	23,81	16.10.15
2	ИБ-302	1,71	0,41	16.10.15
3	ИБ-303	1,51	0,36	16.10.15
4	ИБ-304	3,68	0,88	16.10.15
5	ИБ-305	0,83	0,20	16.10.15
6	ИБ-280 (1%)	27,05	6,44	18.06.15
7	ИБ-277(1%)	23,21	5,53	18.06.15
8	ИБ-277(0,5%)	8,79	2,09	18.06.15
9	ИБ-277 (3,5%, порошок)	9,10	2,08	18.06.15
10	ИБ-282(2%)	41,51	9,48	18.06.15
11	ИБ-281(1,3%)	22,90	5,23	18.06.15
12	ИБ- 278(0,85%)	16,94	3,87	18.06.15
13	ИБ- 278(3,5%, порошок)	83,62	19,79	18.06.15
14	ИБ-278 (3,5% р- р WDS на 0,55 ACV)	13,64	0,00	18.06.15
15	ИБ- 290(0,9%)	1,06	3,23	06.07.15
16	ИБ-	1,26	0,00	06.07.15

	289(0,9%)			
17	ИБ-286(1%)	1,77	0,25	06.07.15
18	ИБ-220/2(1,2%)	1,09	0,30	06.07.15
19	ИБ-291(1%)	4,40	0,42	06.07.15
20	ИБ-293	0,94	0,26	06.07.15
21	ИБ-298А	4,79	1,04	02.09.15
22	ИБ-298В	3,15	0,22	02.09.15
23	ИБ-298С	1,43	1,13	02.09.15
24	ИБ-299А	2,54	0,75	02.09.15
25	ИБ-299В	1,32	0,34	02.09.15

Нормативные требования к фармацевтической субстанции, разработанные в результате анализа лабораторных образцов, приведены в таблице:

Таблица 25. Нормы качества лабораторных образцов субстанции
ациклогермания

Показатель	Норма
Описание	Белый или почти белый кристаллический порошок без запаха
Подлинность	Инфракрасный спектр субстанции, снятый в области от 4000 до 650 см ⁻¹ по положению полос поглощения должен соответствовать прилагаемому рисунку спектра стандартного образца
	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора
	При проведении реакции Сакагучи должно образовываться устойчивое оранжево-красное окрашивание
	При реакции с хлоридом кальция должен образовываться белый осадок при кипячении раствора
Растворимость	Субстанция должна быть очень легко растворима в воде очищенной
Прозрачность раствора	Раствор субстанции в воде очищенной должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном I
Цветность раствора	Раствор субстанции в воде очищенной должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном Y7
pH	pH составляет от 2,0 до 2,5 (1% водный раствор)
Посторонние примеси	Единичной неидентифицированной примеси

	должно быть не более 0,5%. Суммы примесей должно быть не более 1%. Содержание гуанина в субстанции ациклогермания должно составлять не более 0,5 %.
Количественное определение:	Содержание германия в субстанции должно быть в пределах от 10,0 % до 12,5%
	Содержание ацикловира в субстанции должно быть в пределах от 16,0 % до 19,0 %

Выводы к Главе 3.

1. Изучены физико-химические свойства и спектральные характеристики лабораторных образцов ациклогермания.
2. Определено количественное содержание компонентов основного вещества и примесей в субстанции ациклогермания.
3. Установлены нормы качества для проекта нормативной документации для субстанции ациклогермания.
4. Подготовлен проект нормативной документации для субстанции ациклогермания.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ АЦИКЛОГЕРМАНИЯ (ГЕЛЬ).

4.1 Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись образцы геля ациклогермания 3%, ООО «ВДС Фарма». Объект представлял собой бесцветный либо желтоватый гель с мятным запахом [22].

Таблица 26. Компоненты лекарственной формы ациклогермания (гель)

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

Таблица 27. Перечень изученных образцов лекарственной формы ациклогермания.

№	Код серии препарата	Содержание ацикловира (%)	Содержание основной примеси (гуанина) относительно ацикловира, %	Дата начала анализа
1	WDS-1 гель 3% 0114	0,49	0,11	24.10.14
2	WDS-1 гель 3% 0914	0,47	0,05	24.10.14
3	WDS-1 гель 3% (0915)	0,48	0,1	16.10.15
4	WDS-1 гель (07.04)	0,43	0,4	27.04.15
5	WDS-1 гель (1214)	0,4	0,98	15.01.15
6	WDS-1 гель (1013)	0,0051	2956	15.01.15

4.2 Модификация методов качественного и количественного анализа ациклогермания для анализа лекарственной формы

Легкая водорастворимость геля ациклогермания, как основного действующего вещества, так и вспомогательных компонентов лекарственной формы, позволяет использовать для его анализа методы контроля качества для фармацевтической субстанции с минимальными модификациями. Для количественного определения и определения содержания примесей был предложен метод пробоподготовки, заключающийся в растворении навесок геля в воде с последующим фильтрованием. Навески образца геля брались по массе. Тексты модифицированных методик контроля качества для анализа геля ациклогермания приведены в Приложении 2 (Проект нормативной документации). Нормы качества для субстанции

4.3 Установление срока хранения лекарственной формы ациклогермания методом ускоренного старения

С целью установления сроков годности лекарственной формы ациклогермания проводили выдерживание лабораторных образцов препарата в сухожаровом шкафу, в пластиковой тубе (упаковке, соответствующей предполагаемой упаковке геля в промышленном производстве). Для подтверждения срока годности 2 года при температуре хранения 25°C препарат не должен был перестать соответствовать требованиям НД после выдерживания в течение 182 дней при постоянной температуре 40±2 °С. Для подтверждения срока годности 3 года при температуре хранения 25°C препарат не должен был изменить свои основные свойства (перестать соответствовать требованиям НД) после выдерживания в течение 274 дней при постоянной температуре 40±2 °С. Контроль основных показателей качества образцов проводили каждые 46 дней (соответствует хранению в течение 6 месяцев).

В результате проведения процедуры ускоренного старения препарат показал критические несоответствия требованиям НД, а именно, недопустимое увеличение содержания основной примеси на контрольной точке, соответствующей полутора годам хранения (136 дней), после чего эксперимент был досрочно прекращен. Был сделан вывод о возможном разложении части основного вещества (фрагмента ацикловира) с образованием основной примеси. Подтвержденный срок годности препарата составил 1 год. Подробнее см. таблицу 23.

Таблица 28. Исследование стабильности геля ациклогермания, серия 0915.

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

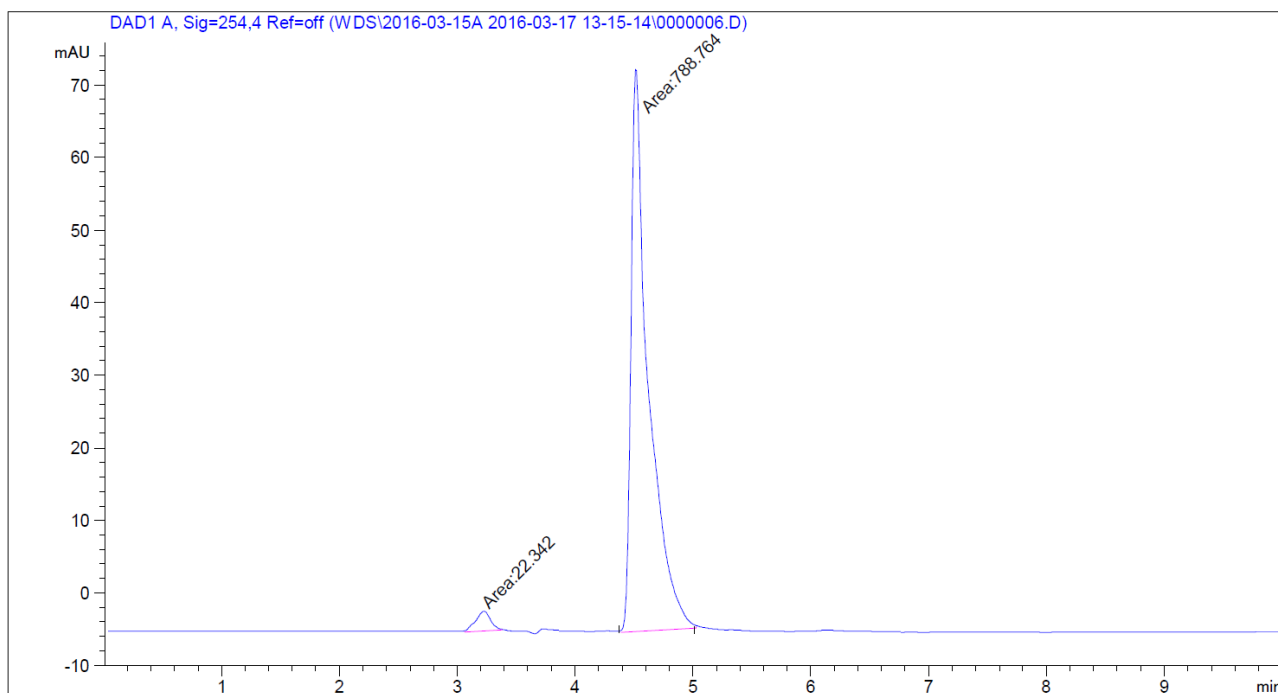


Рисунок 35. Хроматограмма образца геля ациклогермания серия 0915, процедура «Ускоренное старение», 136 дней. Недопустимое содержание основной примеси.

4.4 Выводы к Главе 4.

Произведена модификация методик контроля качества и последующая разработка проекта нормативной документации для лекарственной формы ациклогермания (геля водорастворимого). Было установлено отсутствие специальных требований пробоподготовки для геля и пригодность большинства разработанных ранее методик анализа субстанции для анализа лекарственной формы. Произведена разработка проекта нормативной документации для лекарственной формы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В рамках проведенного исследования были изучены физико-химические свойства субстанции ациклогермания, используемой для производства мягкой лекарственной формы, геля (растворимость, прозрачность, цветность, pH водного раствора). Было принято решение включить в проект нормативной документации испытание растворимости с использованием трех растворителей, воды очищенной, метанола и хлороформа. Было установлено, что раствор субстанции ациклогермания, изученный в соответствии с требованиями ГФ XIII, является прозрачным и бесцветным. Было установлено, что значение pH 1% водного раствора ациклогермания достоверно укладывается в диапазон от 2,0 до 2,2.
2. Изучены спектральные характеристики субстанции ациклогермания, методами ИК-, УФ- ААС- и масс-спектрометрии, с целью оценки их возможности использования при стандартизации субстанции ациклогермания. В качестве основного метода идентификации субстанции ациклогермания предложен метод спектрометрии в инфракрасной области. Произведена расшифровка ИК-спектра субстанции, сделано предположение о соответствии ключевых характеристических полос поглощения структурным фрагментам. Для определения фрагмента германия в составе ациклогермания предложен метод атомно-абсорбционной спектрометрии. Определен диапазон наибольшей линейности для определения германия методом ААС и на основании данной информации разработан метод количественного определения для субстанции.
3. Была изучена хроматографическая подвижность фрагмента ацикловира в составе ациклогермания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ и МС-МС детектированием. Была проведена разработка методики количественного определения ацикловира в

фармацевтической субстанции методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитический диапазон, перенос пробы. Подтверждена пригодность разработанной методики для количественного определения ацикловира в субстанции ациклогермания. Была разработана альтернативная ВЭЖХ-методика количественного определения фрагмента ацикловира в составе ациклогермания, с использованием масс-селективного детектора с тройным квадруполом. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: правильность, прецизионность. Сделано заключение о нецелесообразности включения методики в проект нормативной документации, однако данный метод с небольшими модификациями может быть в дальнейшем использован для анализа биообразцов при доклинических и клинических исследованиях ациклогермания.

4. Была разработана методика анализа чистоты субстанции ациклогермания, на основании разработанных ранее методов ВЭЖХ-анализа, произведена идентификация основной примеси и предложена методика ее количественной оценки. Сделано заключение о том, что основная примесь, имеющая на хроматограммах образцов ациклогермания с высокой вероятностью может является гуанином, или же крайне близким к нему соединением. Была проведена валидация методики количественного определения гуанина в фармацевтической субстанции, при хроматографических условиях, аналогичных условиям ранее разработанной и валидированной методики определения ацикловира с УФ-детектированием. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитический диапазон, перенос пробы. Был определен наиболее интенсивный m/z -переход для гуанина подтверждена

возможность использования для оценки его количественного содержания альтернативного метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием.

5. Было произведено изучение лабораторных образцов ациклогермания в соответствии с разработанными ранее методами. На основании полученных данных определены нормы качества для субстанции ациклогермания.
6. Были изучены физико-химические свойства и установлены нормы качества для ациклогермания в мягкой лекарственной форме (геле). Была подтверждена возможность использования для анализа водорастворимого геля ациклогермания методы контроля качества для фармацевтической субстанции с минимальными модификациями. Для количественного определения и определения содержания примесей был предложен метод пробоподготовки, заключающийся в растворении навесок геля в воде с последующим фильтрованием.
7. Изучена стабильность и установлены сроки годности лекарственной формы ациклогермания. Был сделан вывод о возможном разложении части основного вещества (фрагмента ацикловира) с образованием гуанина в процессе хранения. Подтвержденный срок хранения препарата составил 1 год.
8. На основании полученных данных разработаны проекты нормативной документации для субстанции ациклогермания и лекарственной формы (водорастворимого геля).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

По результатам экспериментальных данных разработаны методики, которые может быть целесообразно использовать в контрольно-аналитических лабораториях для контроля качества ациклогермания, а также препаратов – производных ацикловира, и комплексных соединений германия. Результаты полученных исследований могут быть рекомендованы к использованию в учебном процессе по дисциплинам фармацевтическая химия, аналитическая химия. Результаты работы внедрены в практическую деятельность компании R.O.C.S.© (ООО «ЕВРОКОСМЕД-Ступино»): производство и контроль качества стоматологического геля Герпенокс©.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ACN – ацетонитрил

ЕМА - Европейское агентство лекарственных средств

FA- (formic acid) муравьиная кислота

FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (США)

MF – матричный фактор

MRM – мониторинг множественных реакций

m/z – отношение массы к заряду

N – количество значений для расчетов

RT – (retentiontime) время удерживания на хроматографической колонке

S/N – отношение сигнала к шуму

ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия

ВЭЖХ-МС/МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

KB – коэффициент вариации

КК – контрольный стандарт

НПКО – нижний предел количественного определения

СО – стандартное отклонение

С – массовая концентрация

ЦМВ – цитомегаловирус

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешин С.В. Обзор современных требований к содержанию обязательных разделов нормативной документации для фармацевтических субстанций / С.В. Алешин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – № 4(9). – С. 202–205.
2. Алешин С.В. Использование органических соединений германия в медицине / С.В. Алешин [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – № 2(11). – С. 144–150.
3. Алешин С.В. Разработка методики определения фрагмента ацикловира в составе инновационного лекарственного препарата ациклогерманий методом ВЭЖХ. Идентификация основной примеси / С.В. Алешин [и др.] // Сорбционные И Хроматографические Процессы. – 2016. – № 1(16). – С. 93–99.
4. Амченко А.М. Германийорганические соединения как индукторы иммунного интерферона / А.М. Амченко, М.А. Игнатенко, Я.Е. Хесин // Сб. науч. Трудов "Интерферон - 89". – 1989. – Москва. – С. 35–37.
5. Анурова М.Н. Мягкие лекарственные формы: типы, характеристики, регламентация / М.Н. Анурова, Н. Б. Демина // Фармация. – 2014. – № 8. – С. 44.
6. Анурова М.Н. Обзор современных гелеобразователей в технологии лекарственных форм / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н. Б. Демина // Химико-Фармацевтический Журнал. – 2015. – № 9(49). – С. 57–64.
7. Арзамасцев А.П. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе лекарственных препаратов (обзор) / А.П. Арзамасцев [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1989. – № 4 (23). – С. 486–491.
8. Баринский И.Ф. Эффективность применения поливакцины «Витагерпавак» и иммуномодулятора «Гиаферон» в противорецидивной терапии генитального герпеса / И.Ф. Баринский, Л.М. Алимбарова, А.А. Лазаренко, О.В. Сергеев // Terra medica. – 2013. – № 3 (73). – С. 12.
9. Баринский И.Ф. Инактивированная дивакцина против вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типа как средство эффективной иммунопрофилактики рецидивов генитального герпеса / И.Ф. Баринский, Ф.Р. Махмудов // Вопросы вирусологии. – 2010. – № 1. – С. 35.

10. Бортникова В.В. Доклиническое изучение безопасности противовирусного лекарственного средства Хелепина Д / В.В. Бортникова, Л.В. Крепкова, Т.А. Сокольская // Вопросы Биологической Медицинской И Фармацевтической Химии. – 2014. – № 1(12). – С. 19–25.
11. Бывальцева С.Ю. Препарат герпенекс при лечении лабиального герпеса / С.Ю. Бывальцева, Е.М. Казанкова, О.П. Самойлова // Международный Журнал Экспериментального Образования. – 2015. – № 1(8) – С. 154–155.
12. ВОЗ. Международные медико-санитарные правила. – 2005. – С. 17–86.
13. Гусев А.В. Разработка методик анализа субстанции ноопепта для создания государственного стандартного образца (ГСО) / А.В. Гусев // Химико-фармацевтический журнал. – № 12 (41). – С. 44–47.
14. Долгова И.Г. Фармакоэкономические аспекты выбора стратегии при лечении герпетических заболеваний глаз / И. Г. Долгова и др. // Офтальмохирургия. – 2009. – № 1. – С. 33–38.
15. Дуда А.К. Применение противовирусного препарата нового поколения аллокин-альфа в терапии социально значимых вирусных инфекций / А. К. Дуда, Л.П. Коцубайло, Н.В. Окружнов // Актуальная Инфектология. – 2014. – № 4(5). – С. 32–41.
16. Жученко М.А. Рекомбинантные антигены вакцин для лечения вируса папилломы (обзор) / М.А. Жученко // Разработка И Регистрация Лекарственных Средств. – 2016. – № 1(14). – С. 92–98.
17. Иванов В.В. Экологическая геохимия элементов. Книга 3. – 1994. – Москва: Недра. – С. 82–90.
18. Иванова С.З. Фенольные соединения коры лиственницы сибирской / С.З. Иванова [и др.] // Хвойные бореальной зоны. – № 1. – С. 123–128.
19. Исаков В. Герпесвирусные инфекции человека / В. Исаков, Е. Архипова, Д. Исаков. – СПб: СпецЛит – 2013.
20. Исаков В.А. Эффективность вакцины Витагерпавак для профилактики простого герпеса с монотонным типом рецидивирования / В.А. Исаков, Д.К. Ермоленко, Д.В. Исаков // Эффективная Фармакотерапия. – 2013. – № 40. – С. 6–12.
21. Карташов В.С. Идентификация сульфаниламидных лекарственных средств методом спектроскопии ЯМР / В.С. Карташов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2006. – № 1 (4). – С. 23–24.

22. Кимадзе М.И. Разработка и исследование лекарственных и косметических гелей для регуляции репаративных процессов на базе белковых гидролизатов из гидробионтов. Диссертация на соискание ученой степени кандидата фарм. наук. – Пятигорск – 2006. – 195 с.
23. Коровина А.Н. Поиск ингибиторов репликации вируса герпеса: 30 лет после ацикловира / А.Н. Коровина, С.Н. Кочеткова, М.К. Куханова // *Biotechnol. Acta*. – 2013. – № 6(4). – С. 78–85.
24. Крепкова Л.В. Токсикологическая оценка нового противовирусного препарата гипорамин / Л.В. Крепкова и др. // «Разработка и внедрение новых методов и средств традиционной медицины» «Научные труды». – 2001. – Москва – С. 191–192.
25. Кузнецов А.В. Корригенты вкуса в производстве лекарственных препаратов / А.В. Кузнецов, А.А. Кузнецов // *Фармация*. – 2011. – 2. – С. 53–56.
26. Кузьмичева Н.Н. Тяжело стать маленькой вкусной таблеткой / Н.Н. кузьмичева // *Ремедиум*. – №5. – С. 51–53.
27. Кучеров В.А. Особенности противовирусной терапии генитального герпеса, сочетанного с папилломавирусной инфекцией гениталий / В.А. Кучеров // *Уральский Медицинский Журнал*. – 2012. – № 1(93). – С. 134–139.
28. Лукевиц Э.Я. Биологическая активность соединений германия // Э.Я. Лукевиц и др. – 1990. – Рига: Знание.
29. Мазуркова Н.А. Изучение противогерпетической активности экстрактов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.) / Н.А. Мазуркова и др. // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2016. – № 1(14). – С. 118–127.
30. Марченко Л.А. Лечение больных с рецидивирующим генитальным герпесом / Л.А. Марченко, И. П. Лушкова, А.В. Шуршалина // *Вопросы Гинекологии Акушерства И Перинатологии*. – 2004. – № 6(3). – С. 90–93.
31. Матвеев В.Н. Вязкость и структура дисперсных систем / В.Н. Матвеев, Е.А. Кирсанов // *Вестник Московского Университета*. – Москва: Химия. 2011. – №.4(52).
32. Моисеев И. К. Синтез и противовирусная активность новых производных адамантанового ряда / И. К. Моисеев [и др.] // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2010. – № 10(45). – С. 9-13.

33. Мустафин Р.И. Пероральные лекарственные препараты пролонгированного действия / Р.И. Мустафин // Казанский медицинский журнал. – 1995. – №3. – С. 256-258.
34. ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» //Консультант Плюс. Законодательство. ВерсияПроф [Электронный ресурс] / АО «Консультант Плюс». – М., 2013.
35. Приказ Минпромторга России от 23.10.2009 года № 965, стр. 37. // Консультант Плюс. Законодательство. ВерсияПроф [Электронный ресурс] / АО «Консультант Плюс». — М., 2009.
36. Приказ Минздравсоцразвития России «Об утверждении правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и форм заключения комиссии экспертов по результатам экспертизы лекарственных средств» //Консультант Плюс. Законодательство. ВерсияПроф [Электронный ресурс] / АО «Консультант Плюс». – М., 2013.
37. Правила производства и контроля качества лекарственных средств: ГОСТ Р 52249-2009. — Введ. 2010-01-01. — М.: Изд-во стандартов, 2010. — 139 с.
38. Панкратов О.В. Иммуномодуляторы в лечении герпетической инфекции, вызванной вирусом простого герпеса / О.В. Панкратов // Медицинские Новости. – 2011. – №4. – С. 18–24.
39. Патент РФ № 2475436 (2013) / А.Д. Исаев [и др.] Комплексные соединения германия с производными азотистых оснований пуринового ряда, способы их получения и содержащие их лекарственные средства // заявитель и патентообладатель ООО «ВДС Фарма.»
40. Патент РФ № 2476436 (2013) / А.Д. Исаев [и др.] Комплексные соединения германия с аминокислотами и карбоновыми кислотами //заявитель и патентообладатель ООО «ВДС Фарма».
41. Перцев И.М. Фармацевтические и биологические аспекты мазей / И.М. Перцев, А.М. Котенко, О.В. Чуешов, Е.Л. Халеева; под ред. Перцева И.М. // Х.: НФАУ: Золотые страницы. – 2003. – 287 с.
42. Приказ Минздравсоцразвития России «Об утверждении правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и форм заключения комиссии экспертов по результатам экспертизы лекарственных средств» //Консультант Плюс. Законодательство. ВерсияПроф [Электронный ресурс] / АО «Консультант Плюс». – М., 2013.
43. Ребров В.Г. Витамины и микроэлементы / В.Г. Ребров, О. А. Громова. Москва: АЛЕВ–В – 2003. – С. 315.

44. Рублева О.В. Герпесвирусная инфекция и противовирусные препараты в практике врача / О.В. Рублева // Поликлиника. – 2013. – № 1(2). – С. 80–82.
45. Савенкова М.С. Лечение вирусных инфекций: проблема выбора эффективных противовирусных препаратов / М.С. Савенкова // Педиатрия. – № 6(91). – С. 70–77.
46. Семкина Ю.А. Вспомогательные вещества, используемые в технологии мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов) / Ю.А. Семкина [и др.] // Химико-фармацевтический журнал – 2005. – Т.39. – №9 (39). – С. 45-47.
47. Сеткина С.Б. Биофармацевтические аспекты технологии лекарственных средств и пути модификации биодоступности / С.Б. Сеткина, О.М. Хишова // Вестник Витебского Государственного Медицинского Университета. – 2014. – № 4(13). – С. 162–172.
48. Симованьян Э. Н. Эффективность применения инозина пранобекс у часто болеющих детей с хронической эпштейна-барр вирусной инфекцией: результаты рандомизированного исследования / Э. Н. Симованьян., В. Б. Денисенко, А. В. Григорян // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – № 2 (10). – С. 16–20.
49. Таха Т.В. Опоясывающий герпес: клиника, диагностика, принципы терапии / Т.В. Таха // Научный консультант. – 2012. – № 2(62). – С. 61.
50. Третьякова Е.А., Шилова Е.В. Состояние и перспективы инновационного развития российской фармацевтической промышленности / Е.А. Третьякова, Е.В. Шилова // Управление Экономическими Системами Электронный Научный Журнал. – 2012. – № 40.
51. Тымчишин О.Л. Гепатопротективная активность нового германийорганического биологически активного вещества (медгерм) при экспериментальном гепатите / О.Л. Тымчишин // Казанский Медицинский Журнал. – 2013. – № 5(94). – С. 628–632.
52. Эмсли Д. Элементы / Д. Эмсли. – 1993. – Москва: Мир.
53. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. URL: http://www.rlsnet.ru/tn_index_id_40084.htm (дата обращения 04.03.2017).
54. Asai K. Miracle Cure: Organic Germanium / K. Asai. – 1980. – New York: Japan Publications.
55. Asai K. Bis-carboxyethyl germanium sesquioxide and process for preparing same / A. Kazuhiko. – Pat. 3689516 A USA. – МПК C 07 F 7/00. – C 07 F 7/30.

56. Asai K. Organogermanium compounds / A. Kazuhiko, M. Kazuo. – Pat. 46-2964 Japan. – MПК C 07 F 7/00. – C 07 F 7/30.
57. Asbury R.F. An Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Study of Single Agent DHAD, VP-16, Aclacinomycin, or Spirogermanium in Metastatic Pancreatic Cancer / R.F. Asbury et al. // *Am. J. Clin. Oncol.* – 1994.
58. Aso H. Anti-tumor effects in mice of an organogermanium compound (Ge-132) when different administration methods are used / H. Aso et al. // *Gan To Kagaku Ryoho.* – 1985. – № 12. – P. 2345–2351.
59. Aso H. Induction of Interferon and Activation of NK Cells and Macrophages in Mice by Oral Administration of Ge-132, an Organic Germanium Compound / H. Aso et al. // *Microbiol. Immunol.* – 1985. – № 1(29). – P. 65–74.
60. Aso H. Antiviral activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) in mice infected with influenza virus / H. Aso et al. // *J. Biol. Response Mod.* – 1989. – № 2(8). – P. 180–189.
61. Badger A. M. Generation of suppressor cells in normal rats by treatment with spirogermanium, a novel heterocyclic anticancer drug / A. M. Badger, C. K. Mirabelli, M. Di Martino. // *Immunopharmacology.* – 1985. – № 3 (10). – P. 201–207.
62. Brutkiewicz R.R. Biological activities and antitumor mechanism of an immunopotentiating organogermanium compound / R.R. Brutkiewicz, F. Suzuki // *Vivo Athens Greece.* – 1987. – № 1. – P. 189–203.
63. Budman D.R. Phase I trial of spirogermanium given by infusion in a multiple-dose schedule / D.R. Budman et al. // *Cancer Treat. Rep.* – 1982. – № 1(66). – P. 173–175.
64. Chang Ki K. Effects of Geranti (Biosynthesized Organic Germanium) on the Anticancer and Immuno-enhancement / Ki K. Chang, Ho J. Cha, Ku K. Jong // *Chungbuk Natl. Univ. Korea Res. Inst. Anim. Med.* – 1995.
65. Choi S. Synthesis and biological evaluation of water-soluble organogermanium / S. Choi et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2010. – № 4(45). – P. 1654–1656.
66. Crooks R. J. Valaciclovir a review of its potential in the management of genital herpes / R. J. Crooks // *Antiviral Chem. Chemother.* – 1995. – 6 (Suppl. 1). – P. 39–44.
67. Crumpacker C. S. Ganciclovir. / C. S. Crumpacker // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – №335. – P. 721–729.

68. De Clercq E. Review. Antiviral prodrugs the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy / E. De Clercq, H. J. Field // *British Journal of Pharmacology*. – 2006. – №147. – P. 1-11. – published online 14 November 2005.
69. De Clercq E. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines / E. De Clercq // *Antiviral Res.* – 1987. – №8. P. 261-272.
70. De Clercq E., Holy A., Rosenberg I., Sakuma T., Balzarini J. & Maudgal P. C., A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent / E. De Clercq et al. // *Nature*. – 1986. – №323. – P. 464-467.
71. Elion G. B. Mechanism of action and selectivity of acyclovir / G. B. Elion // *Am. J. Med.* – 1982. – № 1(73). – P. 7 –13.
72. Fennel R.W. History of IUPAC, 1919–1987 / R.W. Fennel. – Oxford: Blackwell Science Ltd, 1994.
73. Fujii A. Effect of organic germanium compound (Ge-132) on experimental osteoporosis in rats / A. Fujii et al. // *Gen. Pharmacol.* – 1993. – № 6(24). – P. 1527–1532.
74. Gerber G.B. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of germanium compounds / G.B. Gerber, A. Léonard // *Mutat. Res.* – 1997. – № 3(387). – P. 141–146.
75. Gilbert C., Julie Bestman-Smith, Guy Boivin Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms / C. Gilbert, J. Bestman-Smith, G. Boivin // *Drug Resist. Updat.* – 2002. – № 2(5). – P. 88–114.
76. Goodman S. Therapeutic Effects of Organic Germanium / S. Goodman // *Med. Hypothesis*. – 1988. – № 3(26). – P. 207–215.
77. Goudgaon N. M. Activity of Acyclic 6-(Phenylselenil)pyrimidine Nucleosides against Human Immunodeficiency Viruses in Primary Lymphocytes / N. M. Goudgaon and Schinazi R. F // *J. Med. Chem.* – 1991. – №34. – P. 3305-3309.
78. Harnden M. R. Synthesis of Novel Series of Acyclic Nucleoside Analogues / M. R. Harnden, S. Baley, M. R. Boyd // *Top. Med. Chem. Proc. 4th SCI-RSC Med. Chem. Symp. Cambridge* – 6th-9th. Sept. 1988. – London. – P. 213-244.
79. Hasan A. Synthesis and Biological Studies of Unsaturated Acyclonucleoside Analogues of S-Adenosil-L-homocysteine Hydrolase Inhibitors. / A. Hasan and P. C. Srivastava // *J. Med. Chem.* – 1992. – №35. – P. 1435-1439.
80. Henry M.C. Toxicity of spirogermanium in mice and dogs after iv or im administration / M.C. Henry et al. // *Cancer Treat. Rep.* – 1980. – № 12(64). – P. 1207–1210.

81. Ho C.C. Effects of organogermanium compound 2-carboxyethyl germanium sesquioxide on cardiovascular function and motor activity in rats / C.C. Ho, Y.F. Chern, M.T. Lin // *Pharmacology*. – 1990. – № 5(41). – P. 286–291.
82. ICH Expert Working Group et al. Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products // *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. – 2003.
83. Jeannot F. Synthesis and antiviral evaluation of 3-C-trifluoromethyl nucleoside derivatives bearing adenine as the base / F. Jeannot, C. Mathe, G. Gosselin // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. – 2001. – 20(4-7) – P. 755-758.
84. Jong-Sung Lee Oral single- and repeated-dose toxicity studies on Geranti Bio-Ge yeast, organic germanium fortified yeasts, in rats / Lee Jong-Sung et al. // *J. Toxicol. Sci.* – 2004. – № 5 (29). – P. 555–569.
85. Keppeler K. Synthesis and Antiviral Activity of Acyclic Derivatives of 5-Ethyl-2'-Deoxyuridine / K. Keppeler, G. Kiefer, E. De Clercq // *Arch. Pharm.* – 1986. – №319. – P. 360-365.
86. Kim S. E Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Infections in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome / S. E. Kim et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1989. – №320. – P. 293–296.
87. Lee Jong-Sung Oral single- and repeated-dose toxicity studies on Geranti Bio-Ge yeast, organic germanium fortified yeasts, in rats / Jong-Sung Lee et al. // *J. Toxicol. Sci.* – 2004. – № 5 (29). – P. 555–569.
88. Mirabelli C.K. Pharmacological activities of spirogermanium and other structurally related azaspiranes: effects on tumor cell and macrophage functions / C.K. Mirabelli et al. // *Anticancer. Drug Des.* – 1989. – № 3(4). – P. 231–242.
89. Mironov V.F. Reactions of trichlorogermane with acrylic acid and its derivatives / V.F. Mironov, E.M. Berliner, T.K. Gar // *Zhurnal Obshchei Khimii*. – 1967. – № 37. – 911–912.
90. Morfin F. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs / F. Morfin, D.Thouvenot // *J. Clin. Virol.* – 2003. – № 1 (26). – P. 29–37.
91. Myron L.J. Resistance of Herpes Simplex Virus Infections to Nucleoside Analogues in HIV-Infected Patients / L.J. Myron, T.H. Bacon, J.J. Leary // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – № 5(39). – P. 248–257.
92. Phan Dana D. Intra- and Interindividual Variabilities of Valacyclovir Oral Bioavailability and Effect of Coadministration of an hPEPT1 Inhibitor / Dana D. Phan et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – № 7(47). – P. 2351–2353.

93. Raisin J. Toxicity of an organic Germanium compound: deleterious consequences of a “natural remedy” / J. Raisin et al. // *Schweiz. Med. Wochenschr.* – 1992. – №1 (122) – P. 11–13.
94. Robins M. J. Nucleic Acid Related Compounds. 47: Synthesis and Biological Activities of Pyrimidine and Purine «Acyclic» Nucleoside Analogues / M. J. Robins, P. W. Hatfield, J. Balzarini, and E. De Clercq // *J. Med. Chem.* – 1984. – №27. – P. 1486-1492.
95. Rosenthal K.S. Tromantadine: inhibitor of early and late events in herpes simplex virus replication / K.S. Rosenthal et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1982. – № 6 (22). – P. 1031–1036.
96. Schulz T.F. Antivirale Chemotherapie / T.F. Schulz., D. Falke // *Med. Mikrobiol. Infekt.* – 2012. – P. 763–773.
97. Simões S. Modular Hydrogels for Drug Delivery / S. Simões, A. Figueiras, F. Veiga // *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology.* – 2012. – №3. – P. 185-199.
98. Song W.J. Preparation of organic germanium by yeast cell / W.J. Song, S.C. Lee, T.K. Oh // *Kor J Appl Microbiol Biotechnol.* – 1995. – № 23(1). – P. 87.
99. Suzuki F. Antitumor mechanisms of carboxyethyl-germanium sesquioxide (Ge-132) in mice bearing Ehrlich ascites tumors / F. Suzuki // *Gan To Kagaku Ryoho.* – 1987. – № 1(14). – P. 127–134.
100. Suzuki F. Suppression of tumor growth by peritoneal macrophages isolated from mice treated with carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) / F. Suzuki // *Gan To Kagaku Ryoho.* – 1985. – № 12(11). – P. 2122–2128.
101. Suzuki F. Importance of T-cells and macrophages in the antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132). / F. Suzuki, R.R. Brutkiewicz., R.B. Pollard // *Anticancer Res.* – 1985. – № 5. – P. 479–483.
102. Takeuchi A. Nephrotoxicity of Germanium Compounds: Report of a Case and Review of the Literature / A. Takeuchi et al. // *Nephron.* – 1992. – № 4(60). – P. 436–442.
103. Tanaka H. A New Class of HIV-1-Specific 6-Substituted Acycloauridine Derivatives: Synthesis and Anti-HIV-1 Activity of 1-(2-Hydroxyetoxy)methyl-6-(phenylthio)thymine (HEPT) / H. Tanaka // *J. Med. Chem.* – 1991. – №34. – P. 349-357.
104. Tao S.H. Hazard assessment of germanium supplements / S.H. Tao, P.M. Bolger // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 1997. – № 3(25). – P. 211–219.

105. Tropé C. Phase II study of spirogermanium in advanced ovarian malignancy / C. Tropé et al. // *Cancer Treat. Rep.* – 1981. – № 1(65) – P. 119–120.
106. Wakabayashi Y. Effect of germanium-132 on low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi hypercholesterolemic rabbits / Y. Wakabayashi // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2001. – № 8(65). – P. 1893–1896.
107. Weimann A. Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry / A. Weimann, D. Belling, H. E. Poulsen. // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – № 2(30). – P. e7.
108. Yang M.K. Protective role of germanium-132 against paraquat-induced oxidative stress in the livers of senescence-accelerated mice / M.K. Yang, Y.G. Kim // *J. Toxicol. Environ. Health.* – 1999. – № 12(58). – P. 289–297.
109. Yokochi S. Hepatoprotective Effect of Propagermanium on *Corynebacterium parvum* and Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury in Mice / S. Yokochi et al. // *Scand. J. Immunol.* – 1998. – № 2 (48). – P. 183–191.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Установление норм качества субстанции ациклогермания. Проект
нормативной документации.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Номер реестровой записи № _____

Дата внесения в государственный реестр лекарственных средств

«____» _____ 20__ г.

(наименование юридического лица, на имя которого выдано
регистрационное удостоверение, адрес)

(наименование юридического лица, на имя которого выдано
регистрационное удостоверение, адрес)

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

_____ (номер)

АЦИКЛОГЕРМАНИЙ фармацевтическая субстанция

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

СПЕЦИФИКАЦИЯ

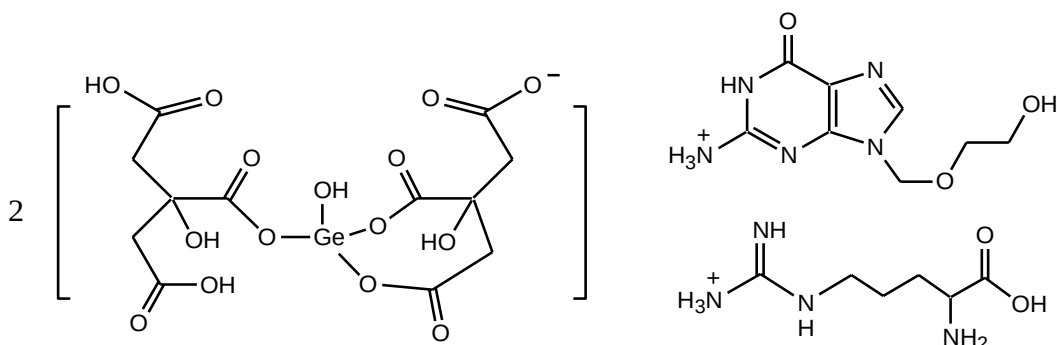
АЦИКЛОГЕРМАНИЙ, фармацевтическая субстанция

Показатель	Метод	Норма
Описание	Визуальный	Белый или почти белый кристаллический порошок без запаха
Подлинность	Спектрометрия в инфракрасной области	Инфракрасный спектр субстанции, снятый в области от 4000 до 650 см ⁻¹ по положению полос поглощения должен соответствовать прилагаемому рисунку спектр стандартного образца ациклогермания (Приложение 1)
	Ацикловир: ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора
	Аргинин: Качественная реакция с α-нафтолом в щелочной среде (реакция Сакагучи)	Должно образовываться устойчивое оранжево-красное окрашивание
	Цитрат-ион: Качественная реакция осаждения хлоридом кальция	Должен образовываться белый осадок при кипячении раствора
Растворимость	ГФ XIII	Субстанция должна быть очень легко растворима в воде очищенной, мало растворима в хлороформе, мало растворима в метаноле
Прозрачность раствора	ГФ XIII	Раствор субстанции в воде очищенной должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном I
Цветность раствора	ГФ XIII	Раствор субстанции в воде очищенной должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном Y7
pH	pH: ГФ XIII; потенциометрический	pНот 2,0 до 2,5 (1% водный раствор)
Посторонние	ВЭЖХ	Единичной неидентифицированной примеси

примеси		должно быть не более 0,5%. Суммы примесей должно быть не более 1%. Содержание гуанина в субстанции ациклогермания должно составлять не более 0,5 %.
Количественное определение:	Германий: Атомно-абсорбционная спектрометрия	Содержание германия в субстанции должно быть в пределах от 10,0 % до 12,5%
	Ацикловир: ВЭЖХ	Содержание ацикловира в субстанции должно быть в пределах от 16,0 % до 19,0 %
Микробиологическая чистота	ГФ XIII	Субстанция должна соответствовать требованиям категории 1.2

Определение. Субстанция АЦИКЛОГЕРМАНИЙ является комплексной соединением, состоящим из двух атомов германия, фрагмента ацикловира, соединенных четырьмя цитрат-ионами и фрагментом аргинина.

Структурная формула.



Эмпирическая формула.



Молекулярная масса.

1301,07 г/моль

Описание. Белый кристаллический порошок без запаха.

Подлинность.

1) Спектрометрия в инфракрасной области. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в области от 4000 до 650 см⁻¹ в диске с калия бромидом, по положению полос поглощения должен соответствовать прилагаемому рисунку спектра АЦИКЛОГЕРМАНИЙ (Приложение 1).

2) ВЭЖХ. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора (*см. раздел «Количественное определение»).

3) Качественная реакция с α-нафтолом в щелочной среде (реакция Сакагучи).

Испытуемый раствор. см. раздел «рН».

α-нафтола спиртовой раствор 0,2%. 0,2 г α-нафтола растворяют в этаноле 96% и доводят объем раствора тем же растворителем до 100 мл.

Мочевины раствор 40%. 10 г мочевины растворяют в небольшом количестве воды очищенной и доводят объем раствора водой очищенной до 25 мл.

В пробирку вносят 2 мл испытуемого раствора, далее прибавляют 2 мл натрия гидроксида раствора 10% и несколько капель α-нафтола спиртового раствора 0,2%. Содержимое пробирки тщательно перемешивают, затем добавляют 0,5 мл натрия гипобромита раствора и тщательно перемешивают. После появления оранжево-красного окрашивания немедленно прибавляют 1 мл мочевины 40% раствора. Должно образовываться устойчивое оранжево-красное окрашивание. Параллельно проводят контрольный опыт.

4) Качественная реакция осаждения хлоридом кальция. К 4 мл испытуемого раствора (см. раздел «рН») прибавляют 4 мл кальция хлорида раствора 0,02 М (ГФ XIII), раствор остается прозрачным. При кипячении полученного раствора образуется белый осадок, растворимый в 0,1 растворе хлористоводородной кислоты (ГФ XIII).

Растворимость. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII. Субстанция должна быть очень легко растворима в воде очищенной, мало растворима в хлороформе, мало растворима в метаноле.

Прозрачность раствора. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII, ОФС 42-0051-07. Раствор субстанции в воде очищенной должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном I.

Цветность раствора. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII. Раствор субстанции в воде очищенной должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном Y₇.

pH.

Испытуемый раствор. 0,5 г (точная навеска) испытуемой субстанции растворяют в воде очищенной и доводят объем раствора водой очищенной до 50 мл.

Проводят потенциометрическое определение pH в соответствии с требованиями ГФ XIII. Измеренное значение pH должно быть в диапазоне от 2,0 до 2,5.

Посторонние примеси.Определение примеси гуанина.

Определение проводят методом ВЭЖХ при условиях, описанных в разделе «Количественное определение».

Для приготовления исходного стандартного раствора гуанина 20 мг стандартного образца (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки подвижной фазой, тщательно перемешивают до полного растворения образца. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят до метки подвижной фазой, тщательно перемешивают.

Хроматографируют растворитель (подвижную фазу), стандартный раствор (не менее 6 раз), испытуемый раствор (не менее 2 раз).

Содержание гуанина в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$\text{(Формула 5)} \quad X = \frac{10 \cdot P \cdot S_1 \cdot a_0}{S_0 \cdot a_1}$$

Где:

S_1 — площадь пика гуанина на хроматограмме испытуемого раствора (среднее значение);

S_0 — площадь пика гуанина на хроматограмме стандартного раствора (среднее значение);

a_1 — навеска субстанции в граммах;

a_0 — навеска стандартного образца гуанина в граммах;

P – содержание основного вещества в стандартном образце гуанина в процентах.

Содержание гуанина в субстанции ациклогермания должно составлять не более 0,5 %.

Неидентифицированные примеси.

. Определение проводят методом ВЭЖХ при условиях, описанных в разделе «Количественное определение». Единичной неидентифицированной примеси должно быть не более 0,5%. Суммы примесей должно быть не более 1%. Содержание любой единичной неидентифицированной примеси в препарате (X_i) в процентах вычисляют по формуле (метод процентной нормализации):

$$(Формула 6) \quad X_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^n S_i} \cdot 100$$

Где:

S_i – площадь пика компонента анализируемой смеси.

Содержание суммы примесей в препарате ($X_{общ}$) в процентах вычисляют по формуле:

$$(Формула 7) \quad X_{общ} = \sum_{i=1}^n X_i$$

Пики с площадью менее 0,1 % от площади пика на хроматограмме испытуемого раствора не учитывают.

Количественное определение.

1) Германий: Атомно-абсорбционная спектрометрия.

Исходный стандартный раствора германия (IV) (100 мкг/мл). Около 0,144 г (точная навеска) германия диоксида (GermaniumOxide, ESPI Metals, США, или другой аналогичного качества, соответствует около 0,1 г германия) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой очищенной до метки. Непосредственно перед использованием 1

мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Калибровочные растворы германия (IV). 1 мл, 5 мл и 10 мл исходного стандартного раствора германия помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят объемы растворов водой очищенной до метки и перемешивают для получения стандартных растворов германия (VI) с концентрацией 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно. Используют свежеприготовленные растворы.

Испытуемый раствор. Около 0,896 г (точная навеска) испытуемой субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют воде очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Непосредственно перед использованием 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объемы растворов водой очищенной до метки и перемешивают.

Измеряют поглощение калибровочных растворов германия (IV) на атомно-абсорбционном спектрометре при длине волны 265,2 нм, используя в качестве источника лампу с полым германиевым катодом. Базовую линию устанавливают по воде очищенной.

Строят калибровочный график зависимости величины поглощения от концентрации германия (мкг/мл).

В тех же условиях измеряют поглощение испытуемого раствора.

Содержание германия в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$\text{(Формула 8)} \quad X_i = \frac{C \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 5 \cdot 100000} = \frac{C \cdot 2}{a}$$

Где:

C – концентрация германия в испытуемом растворе, определенная по калибровочному графику, в мкг/мл;

a – навеска испытуемой субстанции в г;

Содержание германия в испытуемой субстанции должно быть в пределах от 10,0% до 12,5%.

2) Ацикловир. ВЭЖХ.

Компонент А подвижной фазы. 6,24 г натрия дигидрофосфатадигидрата растворяют в 800 мл воды очищенной. Доводят раствор фосфорной кислотой концентрированной (ГФ XII, ОФС 42-0070-07) до значения pH 2,5 потенциометрически. Доводят объем раствора до 1000 мл водой очищенной.

Компонент Б подвижной фазы – ацетонитрил для хроматографии (ГФ XII, ОФС 42-0070-07).

Испытуемый раствор. Около 0,1 г (точная навеска) испытуемой субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в подвижной фазе, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. Срок годности раствора 1 сутки.

Стандартный раствор. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции ацикловира (Aciclovir USP ReferenceStandard, кат. № 1012065 или аналогичного качества) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. Срок годности раствора 1 сутки.

Хроматографические условия:

Колонка	C18, 250 мм x 4,6 мм, 5 мкм
Температура колонки	25 °C
Подвижная фаза	Компонент А и Компонент Б в соотношении 94:6
Скорость потока	1 мл/мин
Детектор	УФ-детектор, длина волны 254± 4 нм
Объем пробы	10 мкл

Время анализа	10 мин
---------------	--------

Время удерживания пика ацикловира около 3,5 минут. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- Относительное стандартное отклонение площади пика ацикловира (RSD), рассчитанное по 10 хроматограммам стандартного раствора, не должно превышать 2%.
- Эффективность колонки (N), рассчитанная по пику ацикловира, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок.
- Коэффициент асимметрии пика ацикловира должен составлять не более 1,3.

Хроматографируют растворитель, стандартный раствор (не менее 6 раз), испытуемый раствор (не менее 2 раз).

Содержание ацикловира в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$(Формула 9) \quad X = \frac{P \cdot S_1 \cdot a_0}{S_0 \cdot a_1}$$

Где:

S_1 — площадь пика ацикловира на хроматограмме испытуемого раствора (среднее значение);

S_0 — площадь пика ацикловира на хроматограмме стандартного раствора (среднее значение);

a_1 — навеска субстанции в граммах;

a_0 — навеска стандартного образца ацикловира в граммах;

P — содержание основного вещества в стандартном образце ацикловира в процентах.

Содержание ацикловира в субстанции должно быть в пределах от 16,0% до 19,0%.

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII, ОФС. Субстанция должна соответствовать требованиям категории 1.2.

Примечание. Реактивы, титрованные растворы и индикаторы, приведенные в настоящей нормативной документации, описаны в соответствующих разделах Государственной Фармакопеи XIII издания, ч. 1.

Приложение 1. Инфракрасный спектр субстанции ациклогермания см. рис. 2 стр. 49.

**Приложение 2. Установление норм качества лекарственной формы
ациклогермания. Проект нормативной документации.**

Номер реестровой записи № _____

Дата внесения в государственный реестр лекарственных средств

« ____ » _____ 20 ____ г.

(наименование юридического лица, на имя которого выдано
регистрационное удостоверение, адрес)

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

_____ (номер)

АЦИКЛОГЕРМАНИЙ гель водорастворимый

АЦИКЛОГЕРМАНИЙ

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

СПЕЦИФИКАЦИЯ

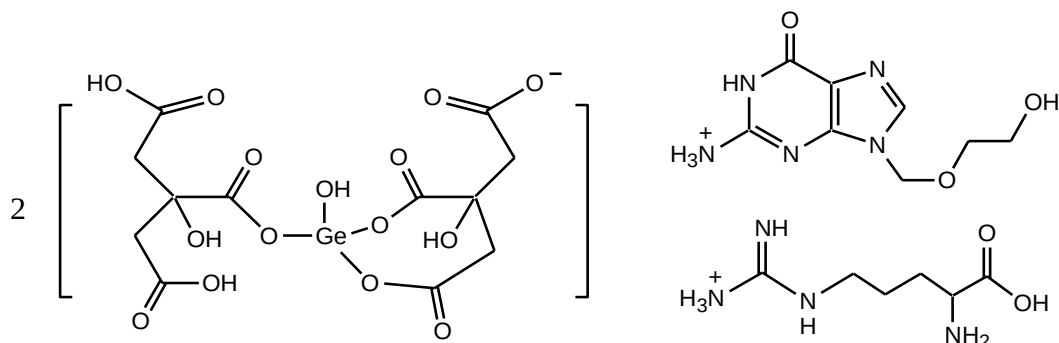
АЦИКЛОГЕРМАНИЙ, фармацевтическая субстанция

Показатель	Метод	Норма
Описание	Визуальный	Белый или желтоватый гель с мятным запахом
Вязкость	ГФ XIII	Динамическая вязкость, измеренная при температуре 30 °C и скорости сдвига 200 должна составлять от 0,6 до 0,7 Па·с
Подлинность	Ацикловир: ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора
	Аргинин: Качественная реакция с α-нафтолом в щелочной среде (реакция Сакагучи)	Должно образовываться устойчивое оранжево-красное окрашивание
	Цитрат-ион: Качественная реакция осаждения хлоридом кальция	Должен образовываться белый осадок при кипячении раствора
Посторонние примеси	ВЭЖХ	Единичной неидентифицированной примеси должно быть не более 0,5%. Суммы примесей должно быть не более 1%. Содержание гуанина должно составлять не более 0,5 %.
Количественное определение:	Германий: Атомно-абсорбционная спектрометрия	Содержание германия в геле должно быть в пределах от 0,3% до 0,37%
	Ацикловир: ВЭЖХ	Содержание ацикловира в геле должно быть в пределах от 0,47% до 0,57%
Микробиологическая чистота	ГФ XIII	Субстанция должна соответствовать требованиям раздела 1.2

Определение. Гель АЦИКЛОГЕРМАНИЙ является мягкой лекарственной формой следующего состава: вода очищенная, пропиленгликоль,

ациклогерманий, гидроксиэтилцеллюлоза, натрия альгинат, полисорбат, метилпарабен, ксилитол, ментол

Структурная формула действующего вещества.



Эмпирическая формула действующего вещества.

$C_{38}H_{45}Ge_2N_9O_{33}$

Молекулярная масса действующего вещества.

1301,07 г/моль

Описание. Белый или желтоватый гель с мятным запахом.

Вязкость. Динамическая вязкость, измеренная на ротационном вискозиметре, при температуре 30 °С и скорости сдвига 200, должна составлять от 0,6 до 0,7 Па·с (ГФ XIII).

Подлинность.

2) ВЭЖХ. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора (*см. раздел «Количественное определение»).

3) Качественная реакция с α -нафтолом в щелочной среде (реакция Сакагучи).

Испытуемый раствор. Около 1 г испытуемого геля (точная навеска) вносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят водой очищенной до метки, тщательно перемешивают, фильтруют через фильтровальную бумагу.

α-нафтола спиртовой раствор 0,2%. 0,2 г α-нафтола растворяют в этаноле 96% и доводят объем раствора тем же растворителем до 100 мл.

Мочевины раствор 40%. 10 г мочевины растворяют в небольшом количестве воды очищенной и доводят объем раствора водой очищенной до 25 мл.

В пробирку вносят 2 мл испытуемого раствора, далее прибавляют 2 мл натрия гидроксида раствора 10% и несколько капель α-нафтола спиртового раствора 0,2%. Содержимое пробирки тщательно перемешивают, затем добавляют 0,5 мл натрия гипобромита раствора и тщательно перемешивают. После появления оранжево-красного окрашивания немедленно прибавляют 1 мл мочевины 40% раствора. Должно образовываться устойчивое оранжево-красное окрашивание. Параллельно проводят контрольный опыт.

4) Качественная реакция осаждения хлоридом кальция. К 4 мл испытуемого раствора (см. раздел «рН») прибавляют 4 мл кальция хлорида раствора 0,02 М(ГФ XIII), раствор остается прозрачным. При кипячении полученного раствора образуется белый осадок, растворимый в 0,1 растворе хлористоводородной кислоты (ГФ XIII).

Цветность раствора. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII. Раствор субстанции в воде очищенной должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном Y₇.

Посторонние примеси.

Определение примеси гуанина.

Определение проводят методом ВЭЖХ при условиях, описанных в разделе «Количественное определение».

Для приготовления исходного стандартного раствора гуанина 20 мг стандартного образца (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки подвижной фазой, тщательно перемешивают до полного растворения образца. 1 мл полученного раствора

переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят до метки подвижной фазой, тщательно перемешивают.

Хроматографируют растворитель (подвижную фазу), стандартный раствор (не менее 6 раз), испытуемый раствор (не менее 2 раз).

Содержание гуанина в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$\text{(Формула 10)} \quad X = \frac{P \cdot S_1 \cdot a_0}{S_0 \cdot a_1}$$

Где:

S_1 — площадь пика гуанина на хроматограмме испытуемого раствора (среднее значение);

S_0 — площадь пика гуанина на хроматограмме стандартного раствора (среднее значение);

a_1 — навеска субстанции в граммах;

a_0 — навеска стандартного образца гуанина в граммах;

P — содержание основного вещества в стандартном образце гуанина в процентах.

Содержание гуанина в испытуемом образце должно составлять не более 0,5 %.

Неидентифицированные примеси.

Определение проводят методом ВЭЖХ при условиях, описанных в разделе «Количественное определение». Единичной неидентифицированной примеси должно быть не более 0,5%. Суммы примесей должно быть не более 1%. Содержание любой единичной неидентифицированной примеси в препарате (X_i) в процентах вычисляют по формуле (метод процентной нормализации):

$$(Формула 11) \quad X_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^n S_i} \cdot 100$$

Где:

S_i – площадь пика компонента анализируемой смеси.

Содержание суммы примесей в препарате ($X_{общ}$) в процентах вычисляют по формуле:

$$(Формула 12) \quad X_{общ} = \sum_{i=1}^n X_i$$

Пики с площадью менее 0,1 % от площади пика на хроматограмме испытуемого раствора не учитывают.

Количественное определение.

1) Германий: Атомно-абсорбционная спектрометрия.

Исходный стандартный раствора германия (IV) (100 мкг/мл). Около 0,144 г (точная навеска) германия диоксида (Germanium Oxide, ESPI Metals, США, или другой аналогичного качества, соответствует около 0,1 г германия) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой очищенной до метки. Непосредственно перед использованием 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Калибровочные растворы германия (IV). 1 мл, 5 мл и 10 мл исходного стандартного раствора германия помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят объемы растворов водой очищенной до метки и перемешивают для получения стандартных растворов германия (VI) с концентрацией 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно. Используют свежеприготовленные растворы.

Испытуемый раствор. Около 1 г (точная навеска) испытуемого геля помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде очищенной, доводят

объем раствора водой очищенной до метки, тщательно перемешивают и фильтруют. Непосредственно перед использованием 2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Измеряют поглощение калибровочных растворов германия (IV) на атомно-абсорбционном спектрометре при длине волны 265,2 нм, используя в качестве источника лампу с полым германиевым катодом. Базовую линию устанавливают по воде очищенной.

Строят калибровочный график зависимости величины поглощения от концентрации германия (мкг/мл).

В тех же условиях измеряют поглощение испытуемого раствора.

Содержание германия в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$\text{(Формула 13)} \quad X_i = \frac{C \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100}{a \cdot 2 \cdot 1000000} = \frac{C \cdot 0,05}{a}$$

Где:

C – концентрация германия в испытуемом растворе, определенная по калибровочному графику, в мкг/мл;

a – навеска испытуемого геля в г;

Содержание германия в испытуемой субстанции должно быть в пределах от 0,3% до 0,37%.

2) Ацикловир. ВЭЖХ.

Компонент А подвижной фазы. 6,24 г натрия дигидрофосфата дигидрата растворяют в 800 мл воды очищенной. Доводят раствор фосфорной кислотой концентрированной до значения pH 2,5 потенциметрически. Доводят объем раствора до 1000 мл водой очищенной.

Компонент В подвижной фазы – ацетонитрил для хроматографии

Испытуемый раствор. Около 1 г (точная навеска) испытуемой субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в подвижной фазе, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. Срок годности раствора 1 сутки.

Стандартный раствор. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции ацикловира (Aciclovir USP ReferenceStandard, кат. № 1012065 или аналогичного качества) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. Срок годности раствора 1 сутки.

Хроматографические условия:

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

Время удерживания пика ацикловира около 3,5 минут. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- Относительное стандартное отклонение площади пика ацикловира (RSD), рассчитанное по 10 хроматограммам стандартного раствора, не должно превышать 2%.
- Эффективность колонки (N), рассчитанная по пику ацикловира, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок.
- Коэффициент асимметрии пика ацикловира должен составлять не более 1,3.

Хроматографируют растворитель, стандартный раствор (не менее 6 раз), испытуемый раствор (не менее 2 раз).

Содержание ацикловира в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$(Формула\ 14) \quad X = \frac{P \cdot S_1 \cdot a_0}{S_0 \cdot 10 \cdot a_1}$$

Где:

S_1 — площадь пика ацикловира на хроматограмме испытуемого раствора (среднее значение);

S_0 — площадь пика ацикловира на хроматограмме стандартного раствора (среднее значение);

a_1 — навеска субстанции в граммах;

a_0 — навеска стандартного образца ацикловира в граммах;

P — содержание основного вещества в стандартном образце ацикловира в процентах.

Содержание ацикловира в субстанции должно быть в пределах 0,48% до 0,57%.

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII. Субстанция должна соответствовать требованиям категории 1.2.

Примечание. Реактивы, титрованные растворы и индикаторы, приведенные в настоящей нормативной документации, описаны в соответствующих разделах Государственной Фармакопеи XIII издания, ч. 1.