

Решения для фарминдустрии

Возможности системы капиллярного электрофореза
«Капель»

- Высочайшая, уникальная эффективность разделения компонентов смесей
- Экспрессность
- Крайне низкий расход реактивов и растворителей
- Отсутствие дорогостоящих колонок с сорбентами и проблем с их старением и заменой
- Низкая стоимость прибора и единичного анализа
- Простота анализа

Актуальными задачами современного фармацевтического производства являются:

- контроль безопасности и качества:
 - синтетических субстанций и природного сырья,
 - активных фармацевтических ингредиентов,
 - вспомогательных веществ,
 - готовых лекарственных средств;
- внутрипроизводственный и межоперационный контроль технологических процессов;
- разработка новых препаратов и отработка методов их анализа;
- изучение фармакокинетики;
- оценка качества воды, используемой в технологических процессах;
- установление фактов фальсификации.

Для решения этих задач необходимы современные, надежные и экономичные методы анализа, среди которых все большее распространение получают инструментальные методы. Об этом свидетельствует появление большого числа общих фармакопейных статей на такие методы в Государственной Фармакопее Российской Федерации (XIV и XV издания).

Группа компаний «Люмэкс» более трех десятилетий производит современные приборы, удовлетворяющие требованиям ГФ РФ XV по инструментальным методам анализа:

- капиллярный электрофорез (ОФС.1.2.1.0022) – системы капиллярного электрофореза «Капель»;
- инфракрасная спектрометрия (ОФС.1.2.1.1.0002) – инфракрасный фурье-спектрометр «ИнфраЛЮМ ФТ-08» с широким набором приставок и специализированных библиотек спектров;
- высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФС.1.2.1.2.0005) – жидкостный хроматограф «Люмахром-М» с набором детекторов (спектрофотометрическим и спектрофлуориметрическим);
- флуориметрия (ОФС.1.2.1.1.0006) и фотометрия (ОФС.1.2.1.1.0003) – фильтровые люминесцентно-фотометрические анализаторы «Флюорат-02-5М» и «Флюорат-02-4М»;
- атомно-абсорбционная спектрометрия (ОФС.1.2.1.1.0005) – атомно-абсорбционный спектрометр «МГА-1000» и анализатор ртути «РА-915М» с приставками для анализа жидких и твердых проб.

При разработке приборов учитывались требования фармацевтической отрасли. Приборы комплектуются программным обеспечением, соответствующим требованиям FDA 21 CFR часть 11. По выбору заказчика во время пуско-наладочных работ специалисты ГК «Люмэкс» проводят работы по квалификации оборудования (IQ/OQ).

Современным методом, в последнее время нашедшим применение в рутинной лабораторной практике, является метод капиллярного электрофореза (КЭ).

Многочисленные варианты метода КЭ используются для разделения:

- заряженных частиц и комплексов,
- нейтральных молекул,
- гидрофобных и гидрофильных компонентов,
- позиционных и оптических изомеров,
- низкомолекулярных соединений,
- белков и олигонуклеотидов.

Примеры использования систем капиллярного электрофореза «Капель» для решения задач фармацевтической отрасли приведены ниже.



ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАТЬИ

Метод КЭ вошел во все современные фармакопеи:

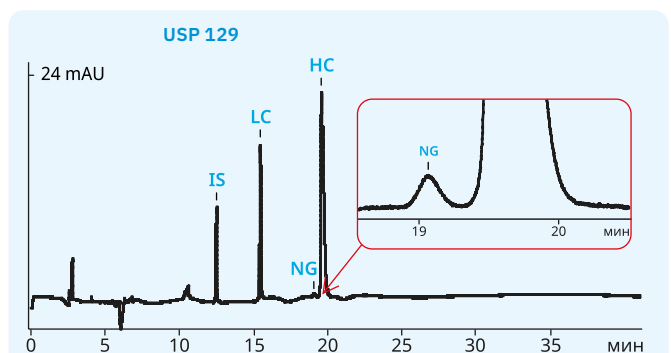
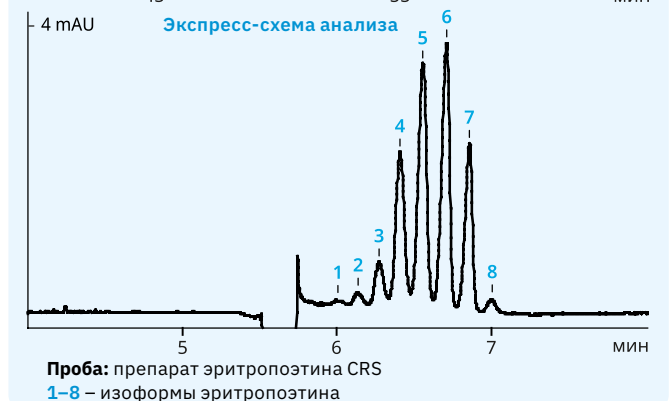
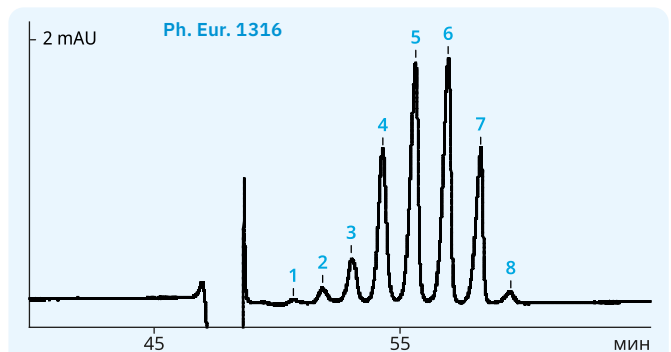
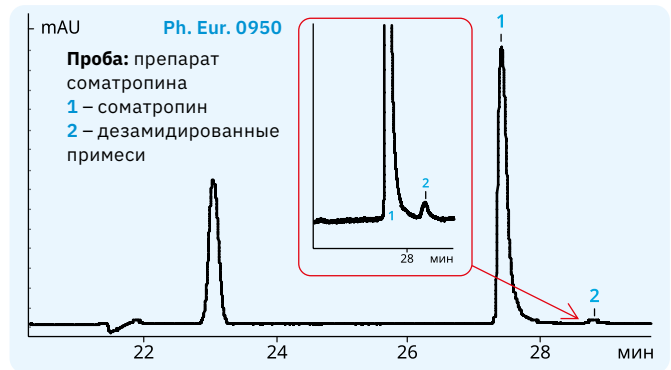
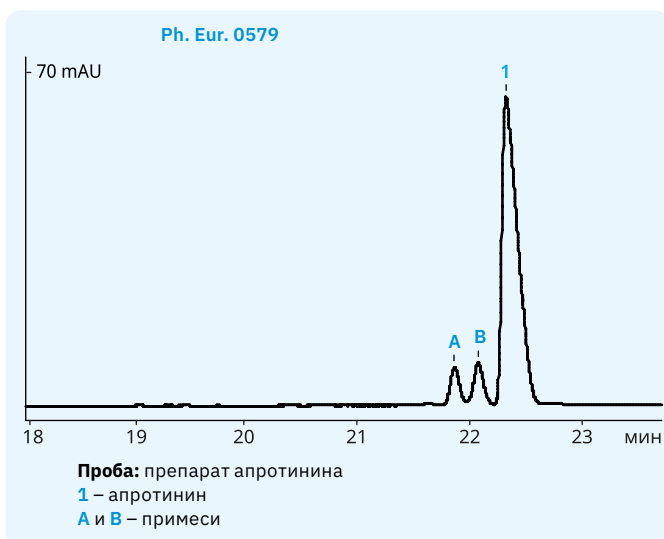
- ГФ РФ XV. ОФС.1.2.1.0022 Капиллярный электрофорез;
- Фармакопея ЕАЭС 2.1.2.37. Капиллярный электрофорез;
- Ph. Eur. 2.2.47 Capillary Electrophoresis;
- USP General Information Ch. <1053> Biotechnology-derived Articles – Capillary Electrophoresis;
- JP General Information 4. Capillary Electrophoresis;
- Brit. Ph. Vol. IV, Appendix III G. Capillary electrophoresis.

Метод КЭ реализован в фармакопейных статьях для решения следующих задач:

- USP 129 – оценка чистоты **рекомбинантных терапевтических моноклональных антител**;
- ФС.2.3.0006; Ph. Eur. 0579, 0580 – определение примесей в **апротинине**;
- Ph. Eur. 0950, 0951, 0952, 2370 – анализ примесей в **соматропине**;
- Ph. Eur. 1316 – идентификация **рекомбинантного эритропоэтина**;
- ФС.2.1.0399; Ph. Eur. 1670 – определение примесей в **глутатионе**;
- Ph. Eur. 2335 – определение энантиомерной чистоты **ропивакаина**;
- ФС.2.1.0077; Ph. Eur. 2366 – определение энантиомерной чистоты **галантамина гидробромида**;
- ФС.2.1.0517 – определение примесей в **натрия лаурилсульфоацетате**;
- Письмо Росздравнадзора от 08.09.2008 № 03И-578/08 – определение примесей в субстанции **гепарина**.

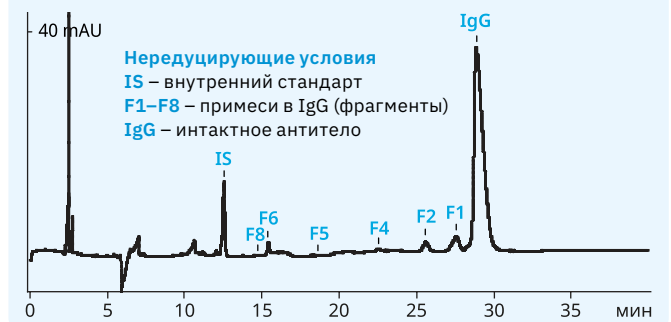
Кроме того, метод КЭ указан в качестве одного из методов в ОФС:

- ОФС.1.7.1.0007 «Лекарственные средства, полученные методами рекомбинантной ДНК» (разделы «Испытания лекарственного препарата», «Испытания биологической фарм. субстанции»), «Испытания фарм. субстанции») – подлинность, чистота;
- ОФС.1.7.1.0013 «ДНК вакцины» (разделы «Испытания лекарственного препарата», «Испытания биологической фарм. субстанции») – концентрация вектора (плазмиды, вирусы);
- ОФС.1.7.1.0014 «Моноклональные антитела для медицинского применения» (разделы «Испытания лекарственного препарата», «Испытания фарм. субстанции») – подлинность, чистота;
- ОФС.1.7.1.0016 «Эритропоэтины» (раздел «Испытания лекарственного препарата») – подлинность, чистота;
- ОФС.1.7.2.0035 «Пептидное картирование» – разделение пептидных фрагментов.



Редуцирующие условия
Проба: препарат рекомбинантного IgG
IS – внутренний стандарт

LC – легкая цепь
NG – негликолизированная тяжелая цепь
HC – тяжелая цепь



АНАЛИЗ БИОМОЛЕКУЛ

А. Капиллярный гель-электрофорез

Антитела, белковые фармацевтические препараты и другие **рекомбинантные белки** – важные продукты фармацевтического и биотехнологического производства. Определение их **чистоты, стабильности и гетерогенности** является очень важной задачей, так как посттрансляционные модификации, а также процессы разложения белков после биосинтеза могут радикально изменить их биологическую активность.

Для разделения белков с разной молекулярной массой в настоящее время широко используется метод электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE).

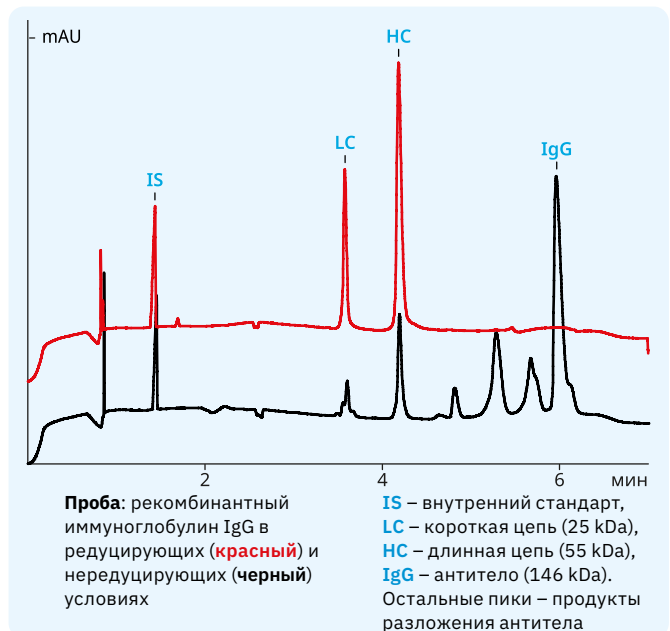
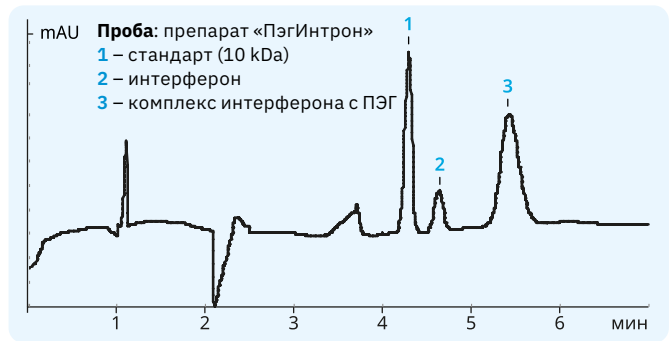
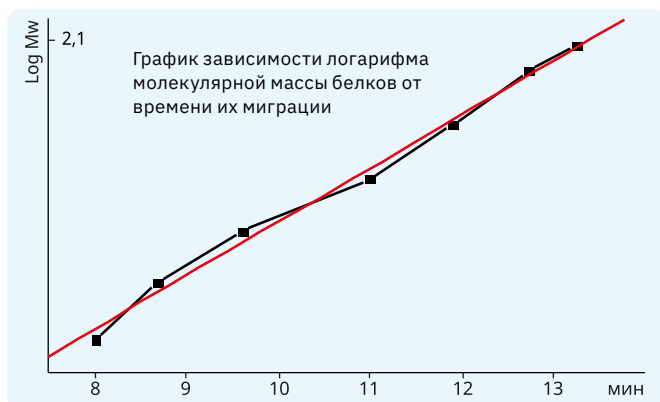
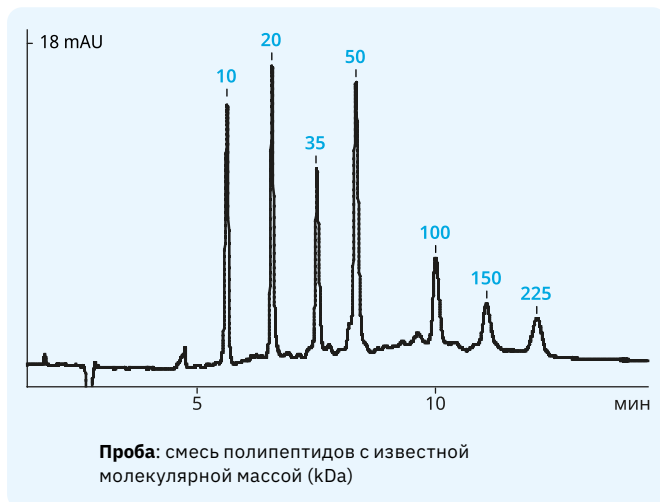
Важной альтернативой ему является капиллярный гель-электрофорез (CGE, КГЭ). В нем используется капилляр, заполненный буфером с полимерными добавками. Перед анализом образец белка денатурируют нагреванием в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) в редуцирующих (с восстанавливающим агентом) или в нередуцирующих условиях. После быстрого охлаждения образец вводят в капилляр, прикладывают высокое напряжение, и белки начинают двигаться сквозь полимерный буферный раствор. Как и в классическом гель-электрофорезе, **разделение достигается за счет различий в молекулярных массах** (т.н. ситовый эффект).

Между логарифмом молекулярной массы белка и временем его миграции существует прямая зависимость. Эта зависимость позволяет проводить прямое определение молекулярной массы неизвестных белков по их времени электромиграции.

С помощью метода КГЭ можно **разделить белки, отличающиеся по массам на 4% и более**.

По сравнению с разделением белков классическим методом SDS-PAGE, метод **капиллярного гель-электрофореза** обладает несколькими **преимуществами**:

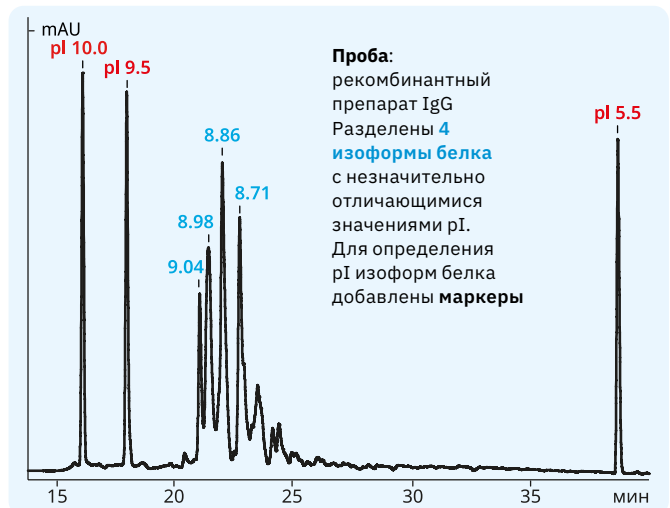
- полная автоматизация разделения;
- прямое количественное определение;
- отсутствие стадии окрашивания;
- низкая стоимость одного определения;
- короткое время анализа.

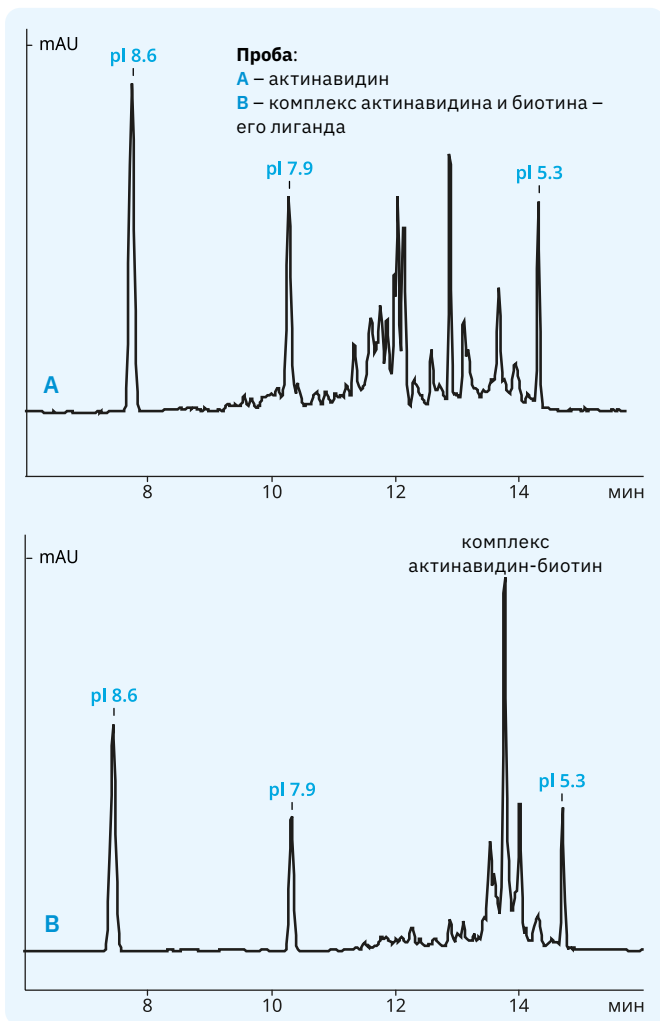


В. Капиллярное изоэлектрическое фокусирование

Метод капиллярного изоэлектрофокусирования (CIEF, КИЭФ) применяется для **разделения белков с примерно одинаковой молекулярной массой, но с различными изоэлектрическими точками** (разделение изоформ с разным зарядом).

В двухстадийном варианте метода капилляр заполняют смесью буферного раствора, амфолитов и пробы. На первом этапе (фокусирование), прикладывается высокое напряжение, в результате чего в капилляре возникает градиент pH и молекулы белка в соответствии со своими изоэлектрическими точками (и.э.т.) фокусируются в узкие зоны, в которых они теряют заряд и электрофоретическую подвижность. На втором этапе (мобилизация), выходную виалу заменяют на виалу с мобилизирующим раствором и снова прикладывают высокое напряжение, после чего сфокусированные зоны начинают двигаться к детектору.





Между и.э.т. и временем миграции существует прямая пропорциональная зависимость.

При помощи данного метода могут быть **разделены белки с изоэлектрическими точками, отличающимися всего на 0.04 единицы pI.**

По сравнению с разделением изоформ белков в полиакриламидном геле, метод **КИЭФ** обладает несколькими **преимуществами:**

- полная автоматизация разделения;
- отсутствие стадии окрашивания;
- низкая стоимость одного определения;
- короткое время анализа.

С. Аффинный капиллярный электрофорез

Аффинная хроматография является одним из наиболее эффективных методов разделения белков и изучения их взаимодействия с другими молекулами.

Как и в случае с классической ВЭЖХ и классическим КЭ, в последнее время серьезным конкурентом аффинной хроматографии является метод аффинного капиллярного электрофореза (АСЕ, АКЭ).

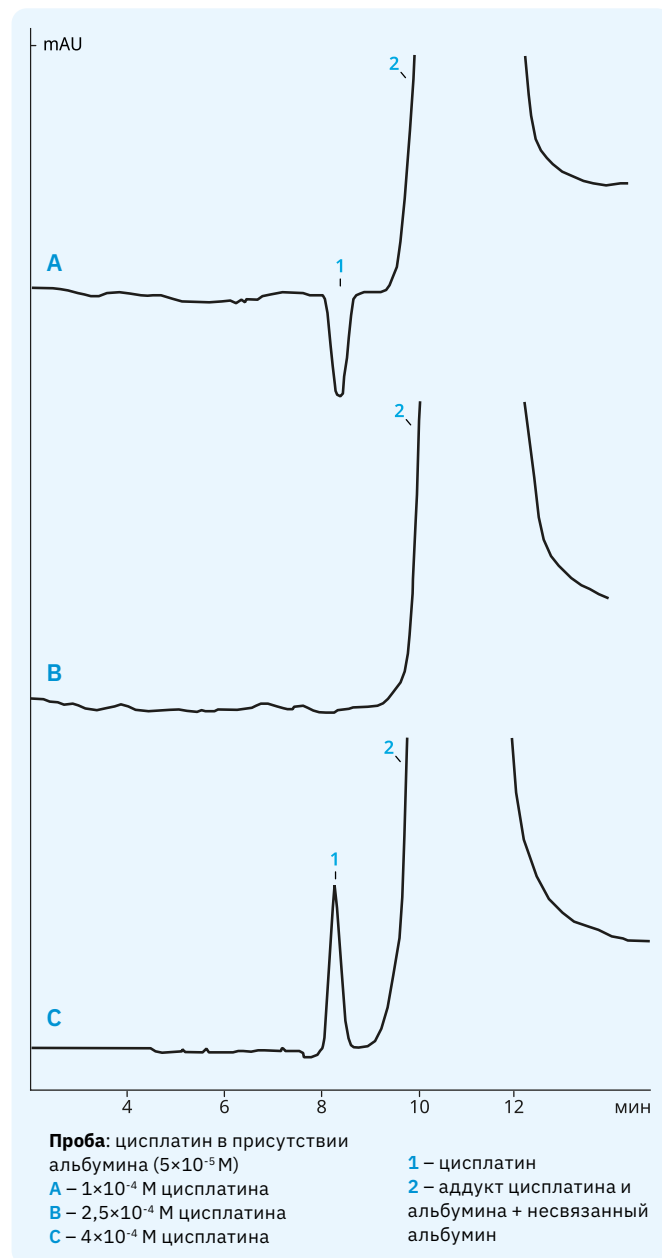
В настоящее время наиболее распространены следующие варианты АКЭ: высокоаффинный вариант (инкубирование реагентов проводят перед проведением анализа) и низкоаффинный (один из реагентов растворен в фоновом электролите).

Объектами изучения в АКЭ являются взаимодействия «антиген – антитело», «белок – лекарство», «клетка – вирус», «вирус – нейтрализующие антитела или лекарства», «белок – ионы металлов» и т. д.

С помощью АКЭ можно **определить один из реагентов, константу связывания, расчетную и визуальную стехиометрию.**

По сравнению с аффинной хроматографией, метод АКЭ обладает несколькими важными **преимуществами:**

- реагенты свободно растворены в буфере;
- анализ происходит в квазифизиологических условиях;
- в капилляре отсутствует твердый носитель, т.е. нет конкуренции в связывании;
- короткое время анализа.



ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Такие физико-химические характеристики молекул как константы диссоциации, константы комплексообразования, константы связывания (для белков), коэффициенты распределения являются важнейшими показателями, которые необходимо учитывать при разработке новых фармакологически активных соединений. Именно они в значительной степени определяют биодоступность веществ, их транспорт в кровеносной системе, проницаемость для мембран.

Учитывая большой объем вновь синтезируемых биологически активных веществ, именно метод КЭ является незаменимым для определения этих параметров.

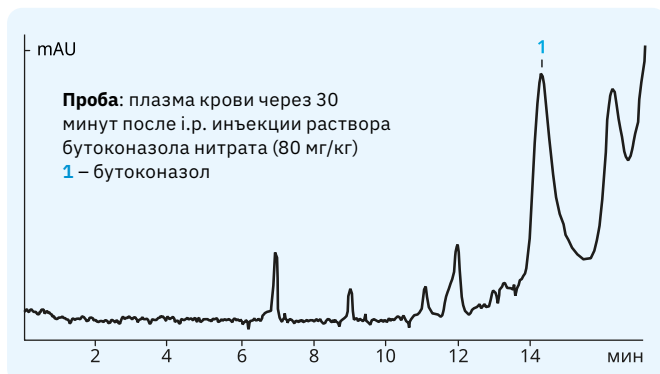
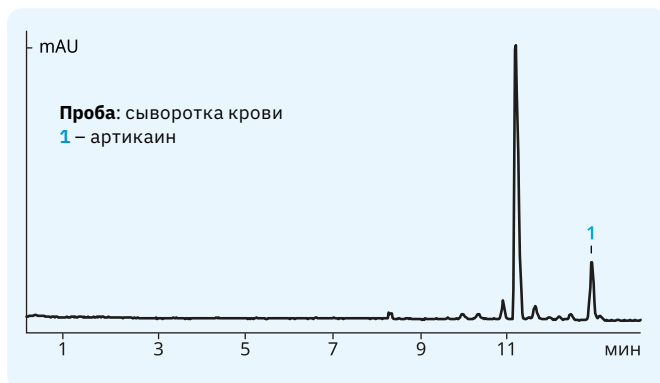
Ультранизкие и ультравысокие значения pH являются крайне неблагоприятными условиями для проведения ВЭЖХ-анализа, в то же время они не препятствуют **определению $\log P$ кислот и оснований** в их незаряженной форме методом КЭ. Для веществ с известными значениями $\log P$ (маркерами) можно построить график зависимости $\log P$ от времени электромиграции, а затем по этому графику вычислить значение $\log P$ для исследуемого химического соединения.

Вторым по важности приложением метода КЭ в физико-химических исследованиях является **определение константы диссоциации pK_a** . Эти величины можно легко рассчитать по временам электромиграции соединения при разных значениях pH. Для соединений, плохо растворимых в водных растворах, в них вводят модифицирующие добавки, например, метанол.

При определении pK_a методом КЭ у исследователя нет необходимости ни в больших навесках вещества (это важно при скрининге), ни в определении точной исходной концентрации. Все это является огромным преимуществом метода КЭ перед титриметрическим методом. Поскольку микропримеси и исследуемое вещество обладают разной электрофоретической подвижностью, то эти примеси не мешают определению pK_a методом КЭ. В то же самое время эти же примеси могут сильно исказить значения pK_a , полученные при потенциометрическом титровании или спектрофотометрически.

ФАРМАКОКИНЕТИКА

Метод КЭ нашел широкое применение для анализа не только исходных биологически активных веществ, но и их метаболитов при клинических исследованиях.



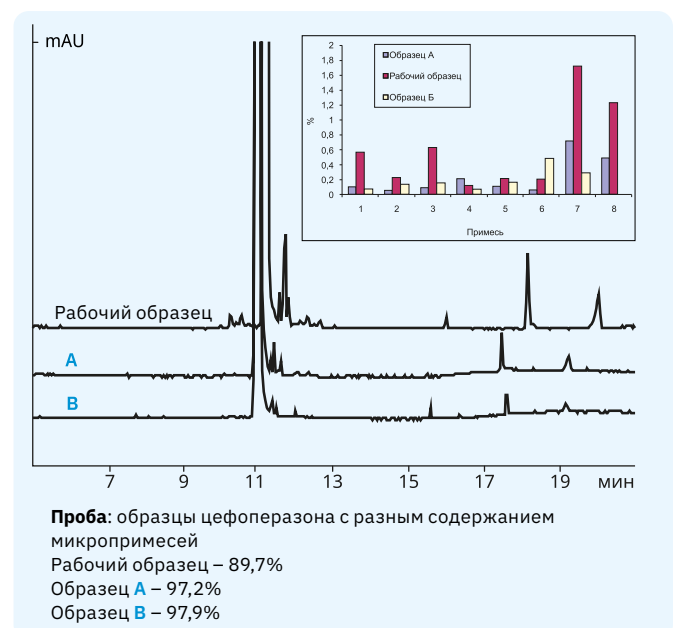
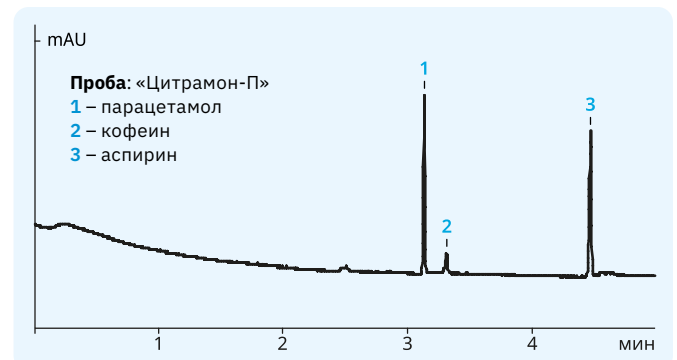
ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

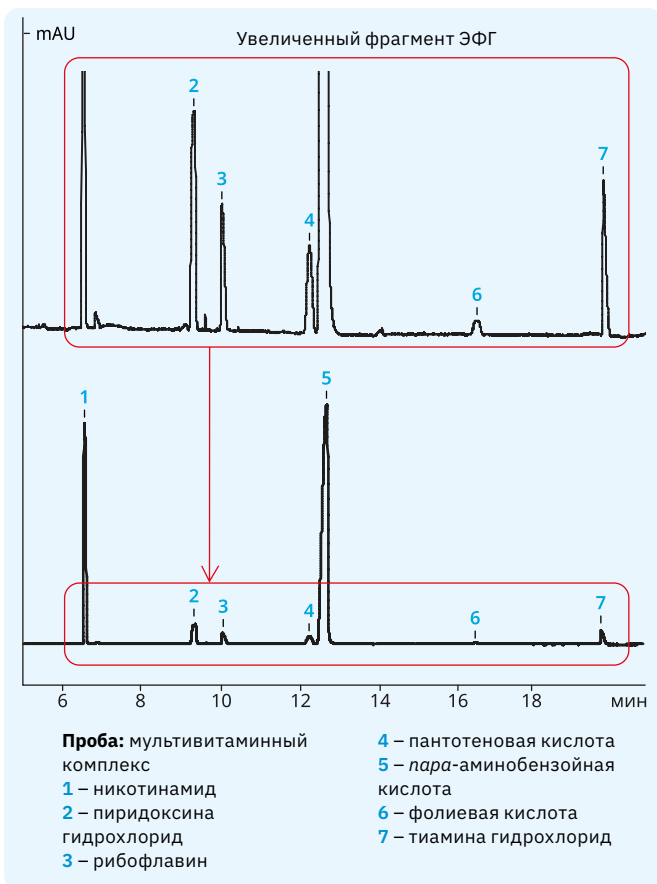
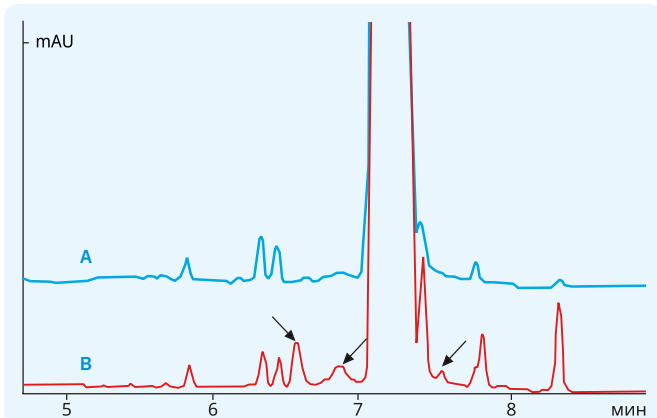
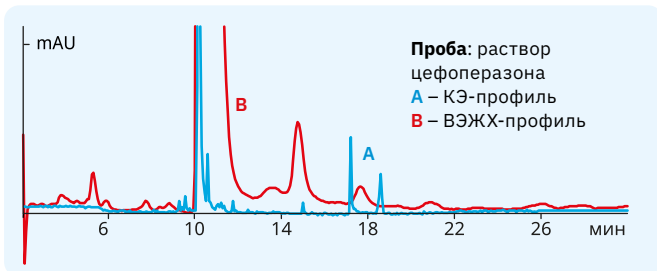
В первых работах по определению активных субстанций методом КЭ исследовались вещества, которые уже существуют в виде солей или содержат легкоионизируемые функциональные группы и растворимы в водных растворах, например, аминокислоты, простейшие пептиды, антибиотики. За этими группами последовали и другие фармакологически активные соединения. Развитие самого метода КЭ позволило разработать методы анализа и малополярных соединений и соединений, плохо растворимых в водных растворах. К началу XXI века было опубликовано более 3000 вариантов анализа методом КЭ более чем для 700 лекарственных средств и исследования в этой области продолжают.

Анальгетики и антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, β -лактамы), барбитураты и трициклические антидепрессанты, пурины и флавоноиды, аминокислоты и витамины – все эти соединения можно определять в готовых фармпрепаратах и сырье для их производства.

Отсутствие стадии дериватизации, легкость подбора условий разделения для близких по структуре и физико-химическим свойствам соединений делает метод КЭ привлекательным для **анализа основного действующего вещества**.

Следующей областью применения метода КЭ является **анализ микропримесей**, а также определение **продуктов разложения**. Обычно считается, что именно для решения этой задачи метод КЭ несколько проигрывает методу ВЭЖХ из-за того, что объем, в котором происходит детектирование веществ в капилляре, гораздо меньше, чем в однопипетном детекторе ВЭЖХ. Современные варианты КЭ позволяют проводить on-line концентрирование веществ, что повышает чувствительность определения в несколько раз. Кроме того, во многих случаях только с помощью метода КЭ можно обнаруживать такие примеси, которые не разделялись с помощью ВЭЖХ.





Можно сказать, что только совместное использование в одной лаборатории метода КЭ и метода ВЭЖХ позволяет получить достоверную информацию о химическом составе исследуемого образца.

Это же замечание справедливо и для решения такой важной практической задачи как выявление фальсификатов.

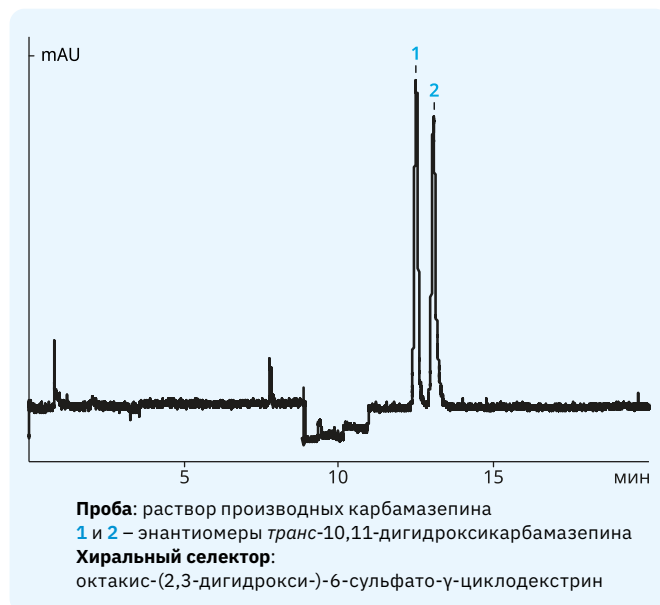
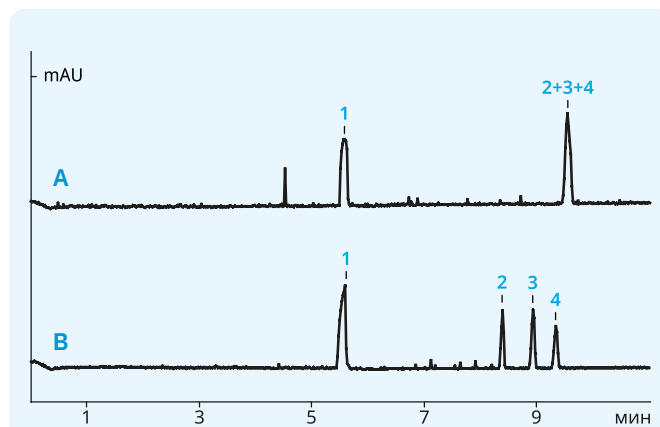
РАЗДЕЛЕНИЕ ИЗОМЕРОВ

Многие вещества, используемые при изготовлении лекарственных средств, являются рацематами (смесью из двух оптических изомеров – энантиомеров), но биологическую активность часто проявляет только один из них. Для определения энантиомерной чистоты чаще всего используют метод ВЭЖХ, но его применение имеет серьезные ограничения: очень высокая стоимость специализированных хроматографических колонок, сложность предсказания эффективности разделения для разных типов соединений, трудность оценки степени модификации применяемых сорбентов. Альтернативой методу ВЭЖХ является метод КЭ, для которого именно **определение энантиомерной чистоты** является наиболее распространенной задачей в практике фармацевтических исследовательских лабораторий.

Значимыми преимуществами метода КЭ являются:

- простота подбора добавок (хиральных селекторов) и легкость оптимизации условий разделения энантиомеров;
- низкая стоимость одного анализа;
- экспрессность.

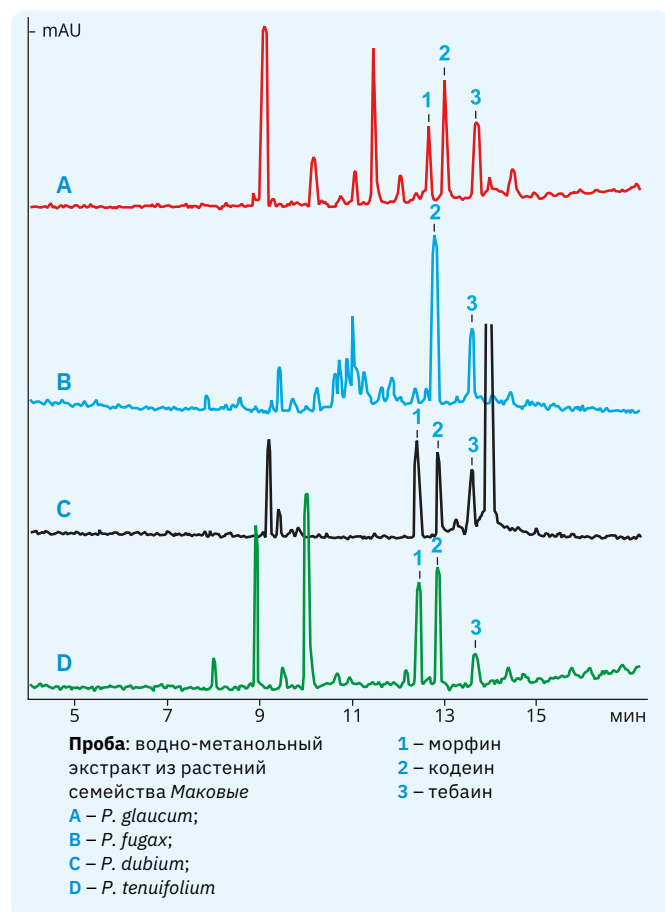
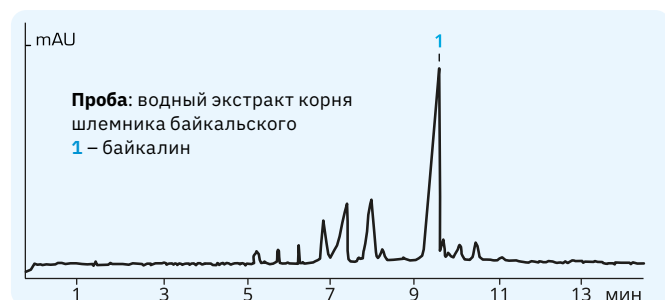
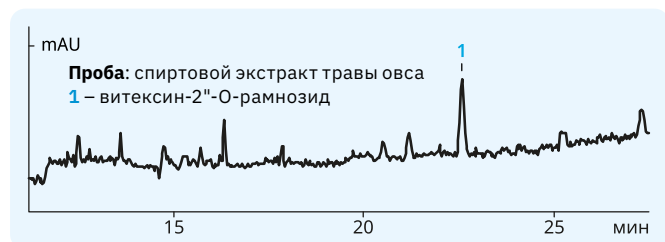
В настоящее время в качестве добавок чаще всего применяют модифицированные β- и γ-циклодекстрины, а также макроциклические антибиотики (например, ванкомицин), большинство из которых коммерчески доступны.



АНАЛИЗ СЫРЬЯ

Растительное сырье входит в состав лечебных сборов, служит источником активных веществ. Среди актуальных задач фармации:

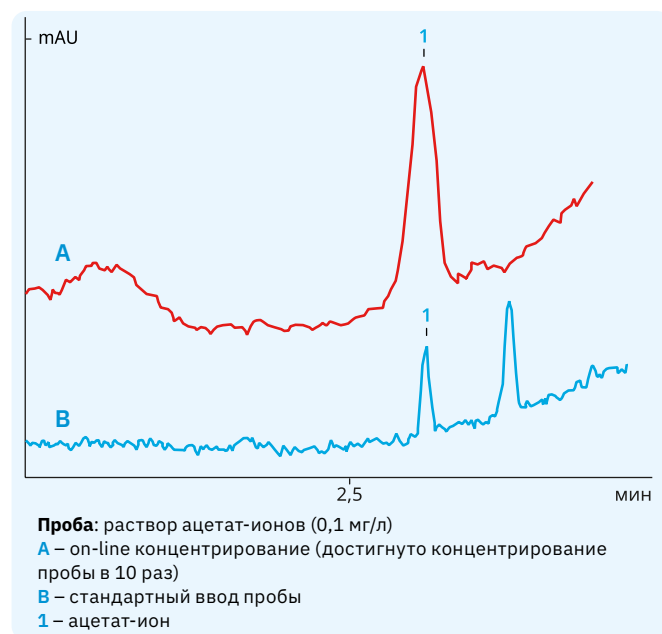
- стандартизация растительного сырья;
- поиск альтернативных источников сырья;
- оптимизация условий выделения активной субстанции;
- создание профилей, индивидуальных для каждого из близкородственных растений.



А. Определение ионного состава воды

Быстрое получение информации о составе воды является важной аналитической задачей на всех этапах фармацевтического производства. По сравнению с методами ионной хроматографии, потенциометрии или титрования, метод КЭ показал свою высокую эффективность при определении ионного состава. За несколько минут с помощью систем «Капель» можно получить полную информацию о концентрациях неорганических и органических анионов (фторидов, хлоридов, бромидов, иодидов, нитритов, нитратов, фосфатов, сульфатов и ацетатов) и неорганических катионов (аммония, калия, натрия, лития, магния, кальция, стронция и бария) в различных типах вод. Пределы обнаружения большинства этих ионов не превышают мг/л, и эти значения можно снизить на порядок за счет применения методов on-line концентрирования.

Многолетний успешный опыт методических разработок в Группе компаний «Люмэкс» был использован при создании двух межгосударственных стандартов по определению анионного (ГОСТ 31867) и катионного (ГОСТ 31869) состава воды. Кроме того, на системах «Капель» можно реализовать положения зарубежных нормативных документов по определению анионов (EPA 6500 и ASTM D6508).



В. Определение противоионов

Многие молекулы лекарственных соединений представляют из себя соли, содержащие противоионы, с помощью которых обеспечивается стабильность вещества, его растворимость, транспорт и т. п. Для определения этих ионов, которые часто являются простыми неорганическими (например, ионы калия, натрия, хлорид-, фосфат-ионы) или органическими (например, цитрат-, фталат-ионы), обычно используют методы классической аналитической химии (титриметрия и т. п.) или сложные и часто весьма трудоемкие инструментальные методы: ионную хроматографию, атомно-эмиссионную спектрометрию.

По сравнению с ними, **метод КЭ** обладает неоспоримыми **преимуществами**:

- уникальной экспрессностью;
- малым расходом реактивов;
- полным отсутствием дорогостоящих хроматографических колонок;
- возможностью за один анализ получить информацию сразу о нескольких имеющихся ионах.



Центральный офис ГК «Люмэкс»
195220, г. Санкт-Петербург,
ул. Обручевых, д. 1, лит. Б
+7 (812) 335-03-36
lumex@lumex.ru
lumex.ru

Московский офис ГК «Люмэкс»
117105, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 28А,
Технопарк «Нагатино», 5 этаж
+7 (495) 981-54-49
centrum@lumex.ru