



СИСТЕМА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА «КАПЕЛЬ®-105М»



РЕШЕНИЯ ДЛЯ ФАРМИНДУСТРИИ

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 их решения 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 (XII издание).

Группа компаний «ЛЮМЭКС» уже не одно десятилетие производит современные приборы, удовлетворяющие требованиям ГФ XII по инструментальным методам анализа:

- инфракрасная спектрометрия (ОФС 42-0043-07) – **инфракрасный фурье-спектрометр «ИнфраЛЮМ® ФТ-08»** с широким набором приставок и специализированных библиотек спектров;
- капиллярный электрофорез (ОФС 42-0082-08) – **системы капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ®»;**
- высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФС 42-0096-09) – **жидкостный хроматограф «ЛЮМАХРОМ®»** с набором детекторов (спектрофотометрическим, флуориметрическим и спектрофлуориметрическим);
- флуориметрия (ОФС 42-0045-07) и фотометрия (ОФС 42-0042-07) – **спектрофлуориметр «ФЛЮОРАТ®-02-ПАНОРАМА»** и **флуориметр серии «ФЛЮОРАТ®-02»;**
- атомно-абсорбционная спектрометрия (ОФС 42-0044-07) – **атомно-абсорбционный спектрометр «МГА-915МД», «МГА-1000»** и **анализатор ртути «РА-915М»** с приставками для анализа жидких и твердых проб.

Все эти приборы также с успехом используются для анализа растительного сырья, а также биологически-активных добавок (по Р 4.1.1672-03).

Новым методом, только 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, гидрофильных компонентов,**
- **позиционных и оптических изомеров,**
- **низкомолекулярных соединений,**
- **белков и олигонуклеотидов.**

С момента своего появления метод КЭ сравнивают с методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). У этих методов много общего: разделение происходит в среде жидкой фазы (буфере или подвижной фазе), в ограниченном пространстве (капилляре или колонке) и с использованием одинаковых принципов детектирования.

В то же время метод капиллярного электрофореза обладает рядом преимуществ:

- **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.**

Как метод, КЭ вошел во все современные фармакопеи:

- ГФ XII. ОФС 42-0082-08;
- Ph. Eur. 2.2.47;
- 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.

Кроме того, метод КЭ вошел в фармакопейные статьи для идентификации рекомбинантного **эритропоэтина** (Ph. Eur. 1316), анализа примесей в **соматотропине** (Ph. Eur. 0950, 0951 и 0952), а также определения примесей в субстанции **гепарина** (Письмо Росздравнадзора от 08.09.2008 № ОЗИ-578/08), определения энантиомерной чистоты **галантамина** (Ph. Eur. 2366) и **ропивакаина** (Ph. Eur. 2335) и примесей в субстанциях **апротинина** (Ph. Eur. 0579 и 0580), **глутатиона** (Ph. Eur. 1670), **левокабастина** (Ph. Eur. 1484).

Применение систем КЭ в фармации не ограничивается только этими фармстатьями. По оценкам европейских экспертов, около половины всех выпускаемых в мире систем КЭ используется в фармацевтическом секторе для решения широкого круга задач – от оценки качества готовой продукции до клинических испытаний.

Группа компаний «ЛЮМЭКС» первая в России и странах СНГ разработала и продолжает серийное производство систем КЭ – приборов серии «КАПЕЛЬ®». За последние годы нашими партнерами в России, КНР, странах Западной Европы были получены интересные результаты по применению систем «КАПЕЛЬ®» в фармации. Некоторые примеры приведены ниже.

А: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОННОГО СОСТАВА ВОДЫ

Вода является важным компонентом современного фармацевтического производства. Она может быть вспомогательным веществом в окончательной рецептуре, растворителем при синтезе органических и неорганических веществ, очищающим веществом для промывки технологических линий, наконец, она является и одним из отходов производства. На всех этапах производства быстрое получение точной информации об ионном составе воды является аналитической задачей. 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 31867-2012) и катионного (ГОСТ 31869-2012) состава воды. Кроме того, на системах «КАПЕЛЬ®» можно реализовывать положения зарубежных нормативных документов по определению анионов (EPA 6500 и ASTM D6508-10).



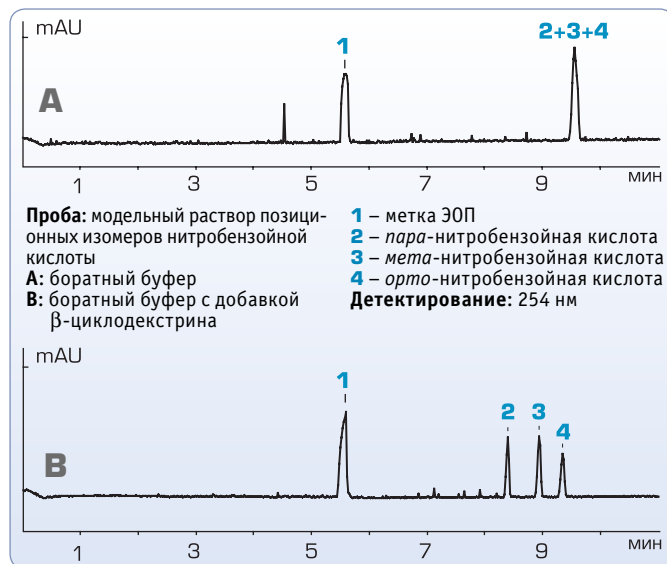
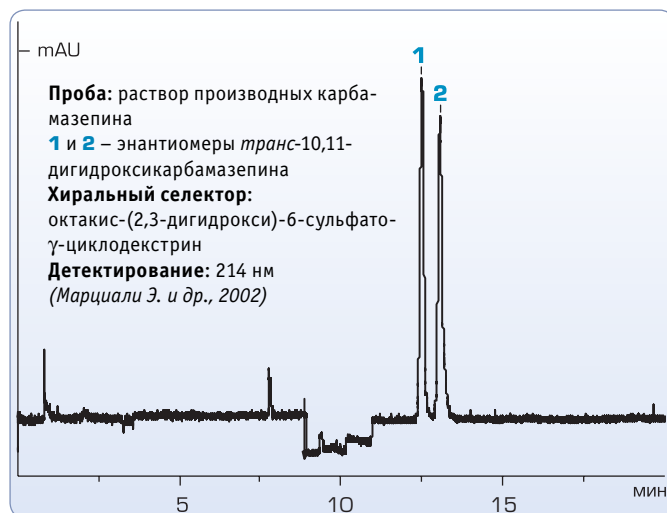
В: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОИОНОВ

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, благодаря своей уникальной экспрессности, малым расходам реактивов, полному отсутствию дорогостоящих хроматографических колонок и возможности за один анализ получить информацию сразу о нескольких имеющихся ионах.

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. Удобной альтернативой методу ВЭЖХ является метод КЭ, для которого именно определение энантиомерной чистоты является наиболее распространенной задачей в практике фармацевтических исследовательских лабораторий.



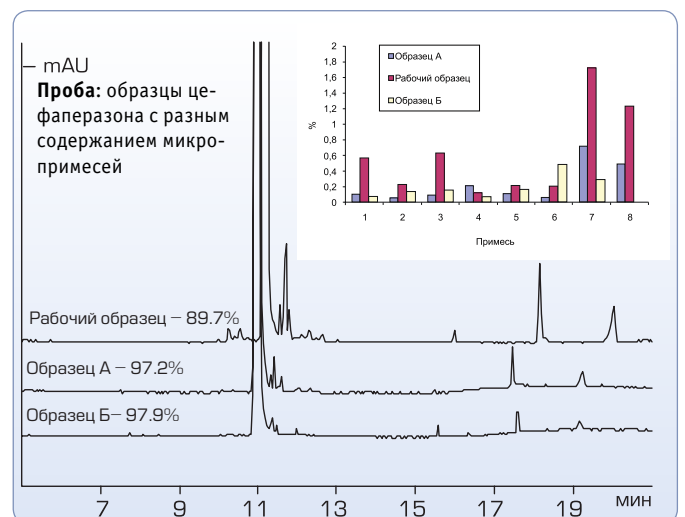
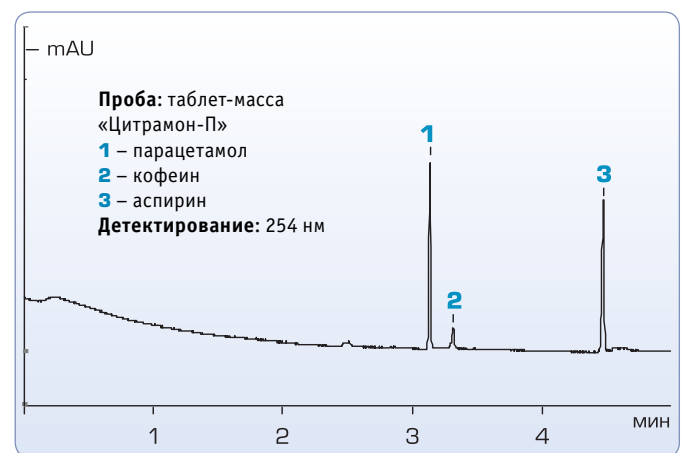
Значимыми преимуществами метода КЭ являются:

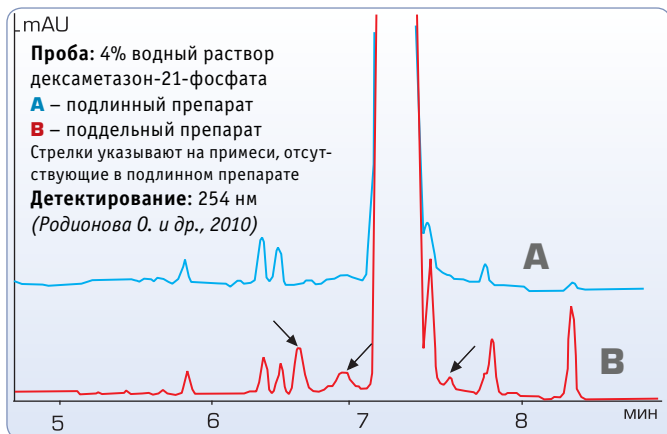
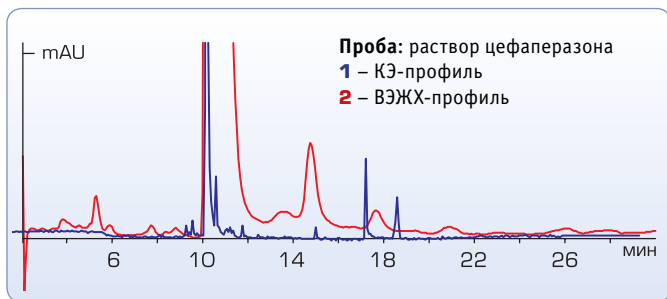
- простота подбора добавок (хиральных селекторов) и легкость оптимизации условий разделения энантиомеров,
- низкая стоимость одного анализа,
- экспрессность одного определения.

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.

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 однотипном 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.

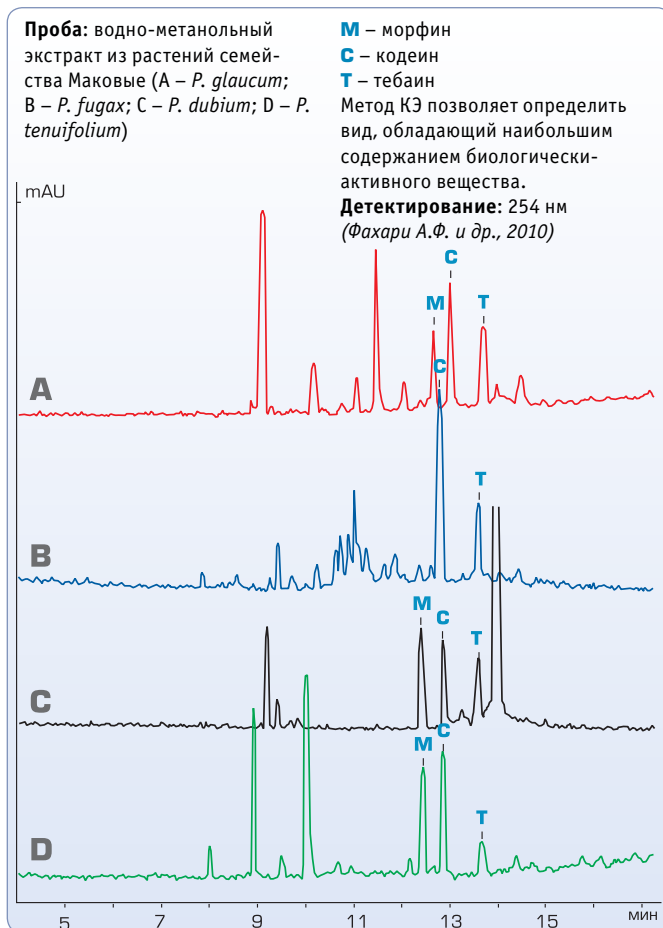
Можно сказать, что **только совместное использование в одной лаборатории метода КЭ и метода ВЭЖХ позволяет получить достоверную информацию о химическом составе исследуемого образца.**

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

АНАЛИЗ СЫРЬЯ

Растительное сырье по-прежнему является одним из важнейших источников сырья в современной фармации. Оно может прямо входить в состав лечебных сборов, применяться для извлечения активного вещества. В этой связи перед фармацевтической наукой и производством возникает целый ряд актуальных задач:

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



Для решения каждой из этих задач существует большой опыт применения метода КЭ, в т. ч. и с помощью систем «КА-ПЕЛЬ®». С его помощью в России, США и Китае, например, определяли флавоноиды (рутин, кверцетин, ононин, изосалилурпозиды, витексин, кумарины) в растительных экстрактах, создавали КЭ профили растений шлемник байкальский, солодка голая и растений семейства *Маковые* и оптимизировали условия выделения биологически-активных веществ, а также проводили поиск растений семейства *Капустные* с максимальным содержанием производных кемпферола.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Такие физико-химические характеристики молекул как константы диссоциации, константы распределения, константы комплексообразования, константы связывания (для белков) 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.

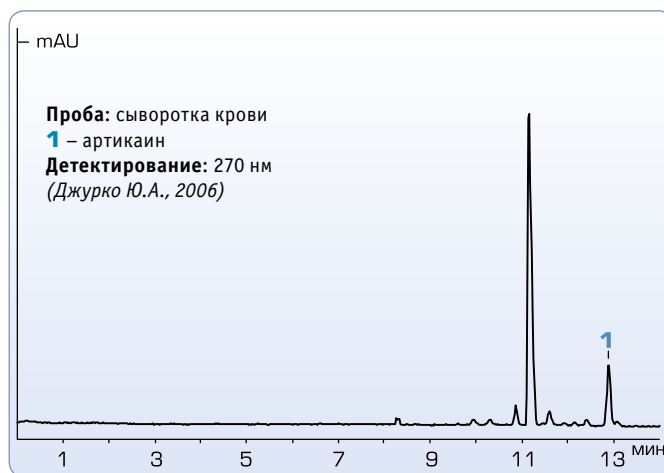
Ультранизкие и ультравысокие значения pH являются крайне неблагоприятными условиями для проведения ВЭЖХ-анализа, в то же время они не препятствуют **определению logP кислот и оснований** в их незаряженной форме методом КЭ. Для веществ с известными значениями logP (маркерами) можно построить график зависимости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

Вторым по важности приложением метода КЭ в физико-химических исследованиях является определение **константы диссоциации pKa**. 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 pKa 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 для определения pKa методом КЭ. В то же самое время эти же примеси могут сильно исказить значения pKa, полученные при потенциометрическом титровании или спектрофотометрически.

ФАРМАКОКИНЕТИКА

Оба сепарационных метода анализа – ВЭЖХ и КЭ – нашли широкое применение для анализа не только исходных биологически-активных веществ, но и их метаболитов при клинических исследованиях.



АНАЛИЗ БИМОЛЕКУЛ

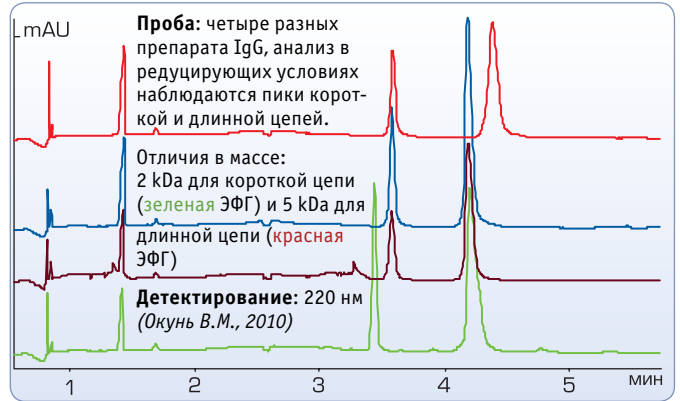
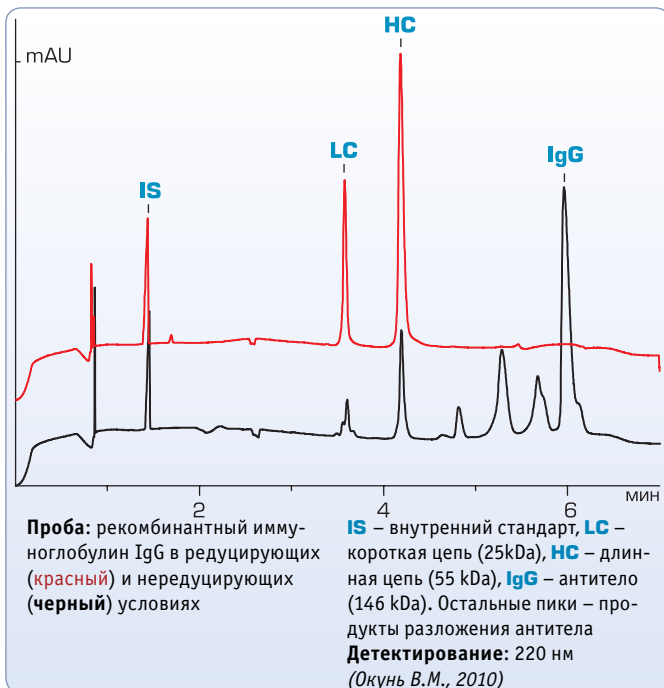
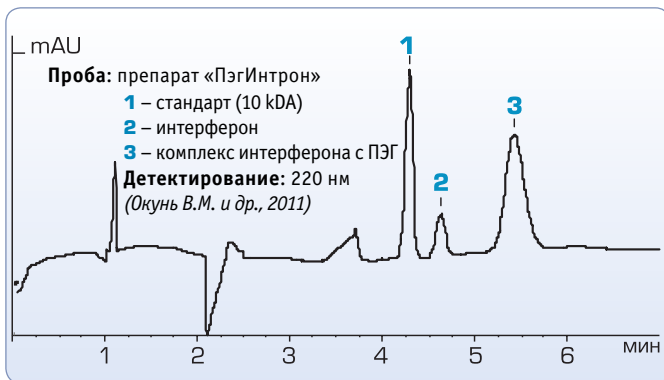
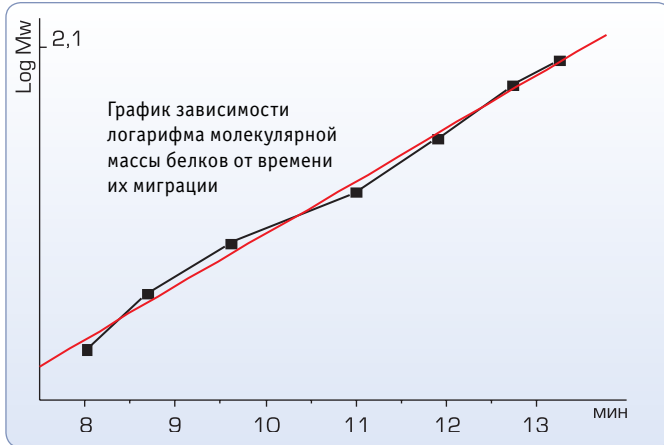
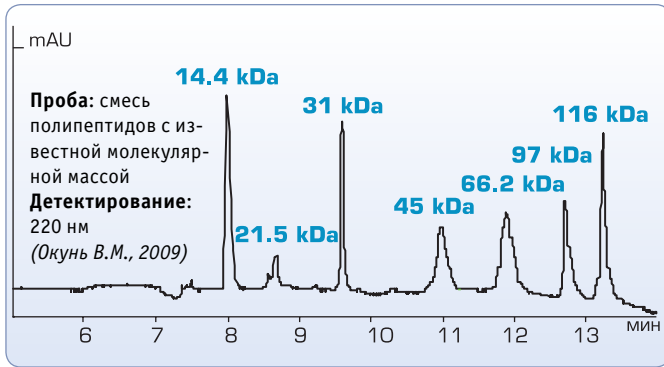
А. КАПИЛЛЯРНЫЙ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

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:

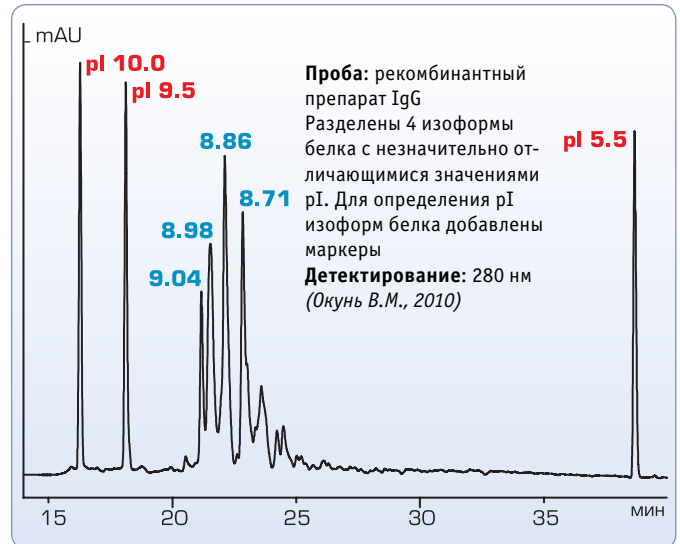
- полная автоматизация разделения;
- прямое количественное определение;
- отсутствие стадии окрашивания;
- низкая стоимость одного определения;
- короткое время анализа.

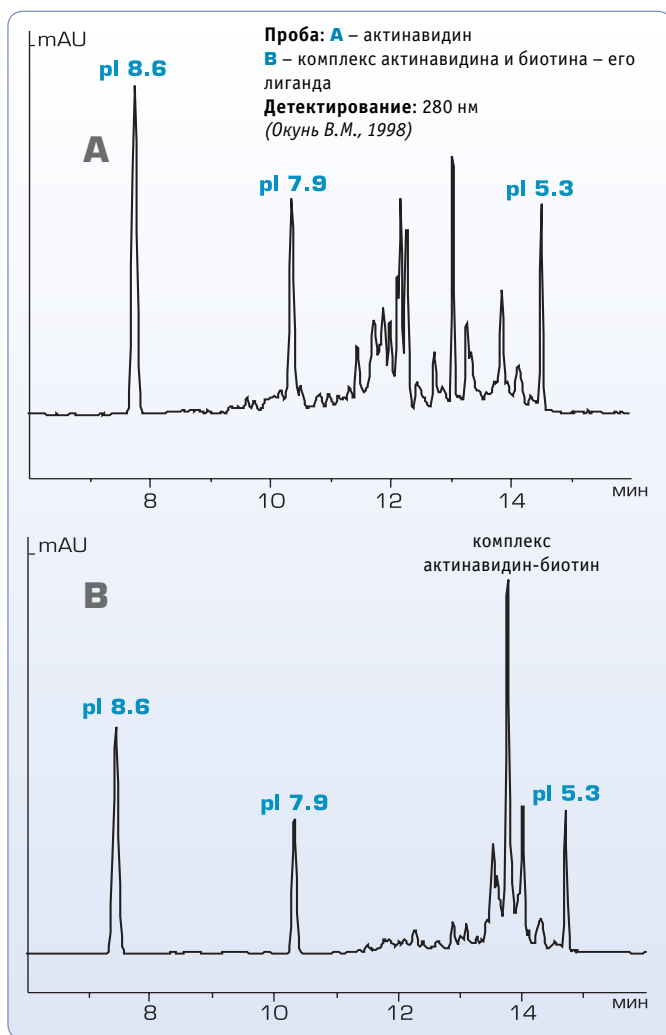
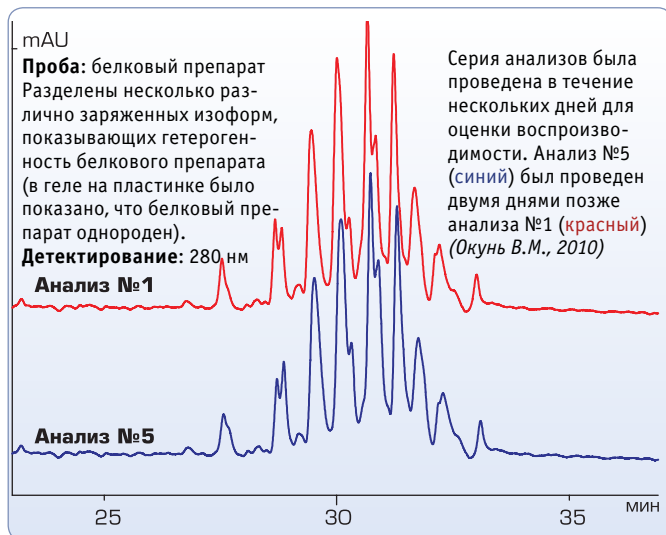
В. КАПИЛЛЯРНОЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

Метод капиллярного изоэлектрофокусирования (СIEF, 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 вилу заменяют на вилу с мобилирующим 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 (АКЭ, АКЭ).

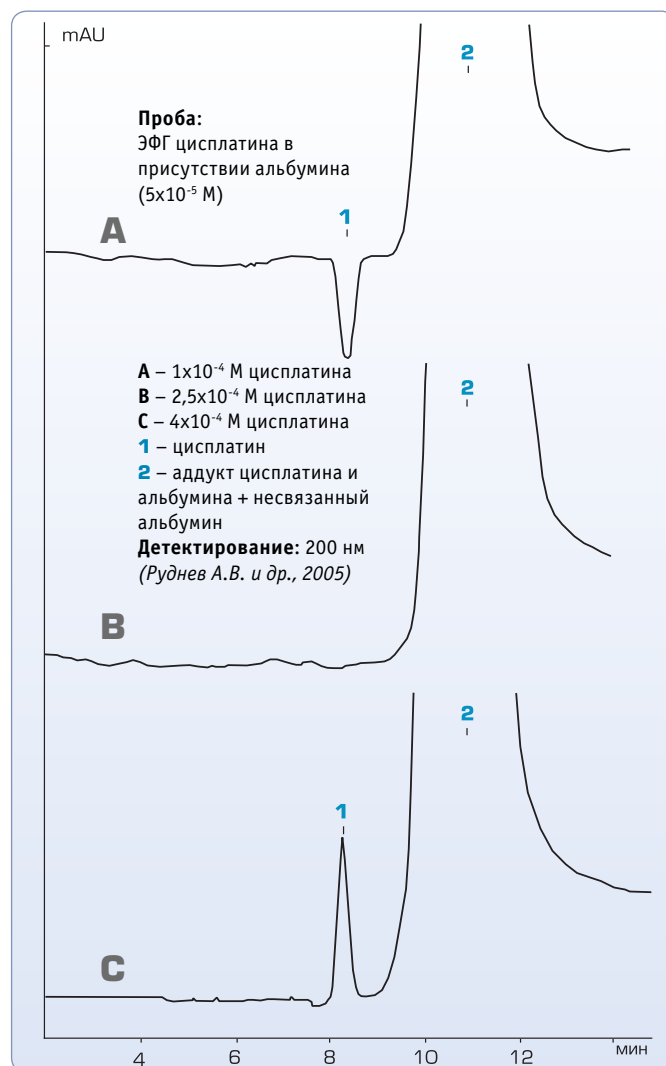
В настоящее время наиболее распространены следующие варианты АКЭ: высокоаффинный вариант (инкубирование реагентов проводят перед проведением анализа) и низкоаффинный (один из реагентов растворен в ведущем электролите).

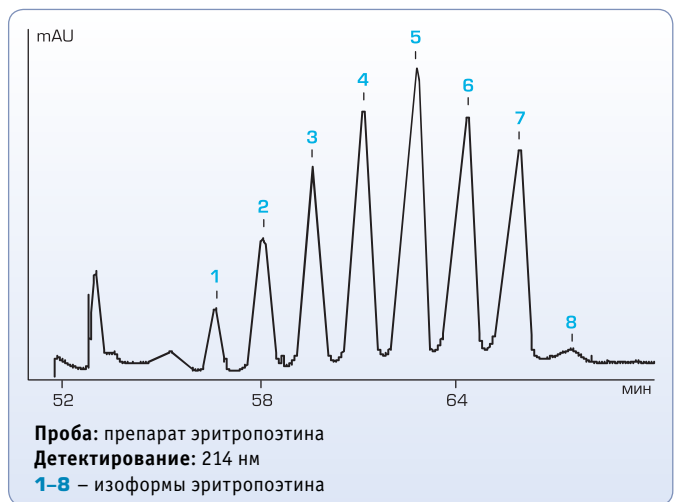
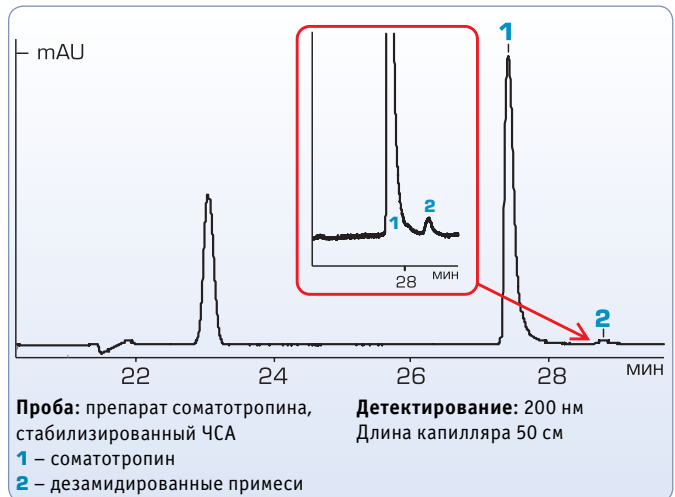
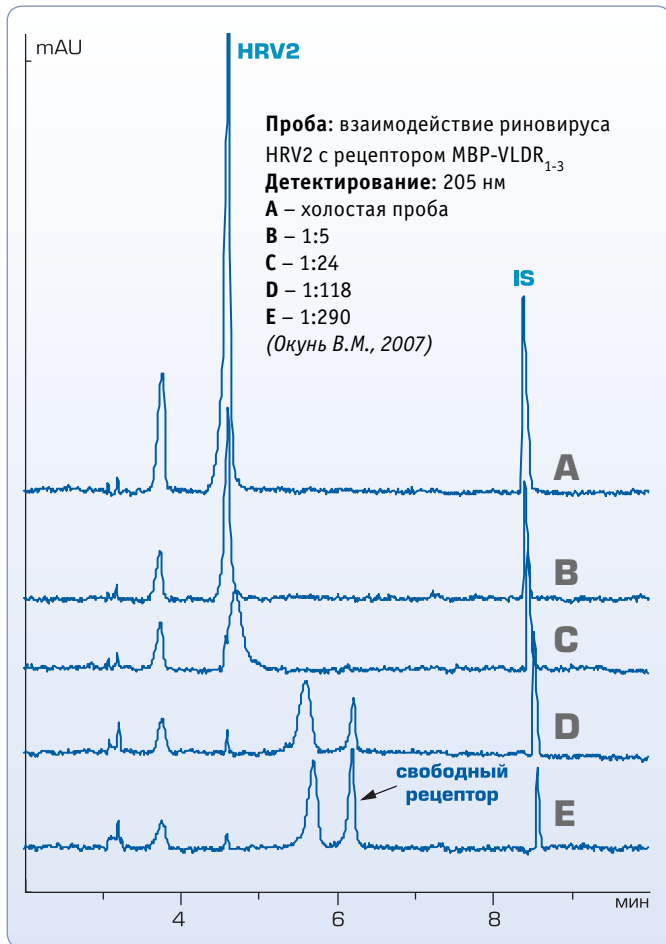
Объектами изучения в АКЭ являются взаимодействия «антиген – антитело», «белок – лекарство», «клетка – вирус», «вирус – нейтрализующие антитела или лекарства», «белок – ионы металлов» и т. д.

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.



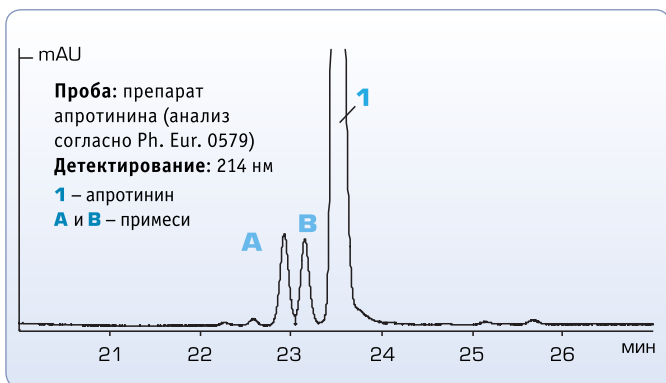


Д. ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАТЬИ

В настоящее время в Европейской Фармакопее метод капиллярного электрофореза введен для анализа следующих препаратов:

- эритропоэтина,
- соматотропина,
- гепарина,
- аprotинина,
- ропивакаина,
- глутатиона,
- левокабастина.

Все эти препараты можно анализировать с использованием системы «КАПЕЛЬ®-105М».



СЕРТИФИКАЦИЯ

Система КЭ «КАПЕЛЬ®-105М» прошла необходимую сертификацию и внесена в Государственные реестры средств измерения стран СНГ:

Госреестр СИ РФ № 17727-11

Госреестр СИ РБ № 03 09 0926 12

Госреестр СИТ Украины № 17727-11

Госреестр СИ Казахстана №KZ.02.03.04489-2012/17727-11

Система КЭ «КАПЕЛЬ®-105М» сертифицирована на соответствие требованиям:

- Технических регламентов Таможенного Союза «О безопасности низковольтного оборудования» (ТР ТС 004/2011) и «Электромагнитная совместимость технических средств» (ТР ТС 020/2011);
- Директив по электробезопасности Европейского Сообщества 73/23/ЕЕС и 89/336/ЕС.

Программное обеспечение, используемое в системе КЭ «КАПЕЛЬ®-105М», полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым при работе в соответствии со стандартами GMP/GLP и ISO.

Центральный офис «ЛЮМЭКС»

192029 Санкт-Петербург, пр. Обуховской обороны, 70, корп. 2

Тел.: +7 (812) 718-5390, 718-5391

Факс: +7 (812) 718-6865

Эл. почта: sales@lumex.ru, lumex@lumex.ru

Почтовый адрес: 190000 Санкт-Петербург, BOX 1234

«ЛЮМЭКС-ЦЕНТРУМ»

117246 Москва, Научный проезд, 20,

строение 3, 6 этаж

Тел.: +7 (495) 981-5449

Эл. почта: byl@lumex.ru

