

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

А.К. Кипчакбаева

*Медициналық фитопрепараттарды жасаудағы
заманауи аспектілері*

Оқу құралы

Алматы, 2018

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР

Дәрілік заттармен жұмыс жүргізгенде мына стандарттарға сілтемелер келтірілген:

МЕМСТ 2237-75 Өсімдік шикізаты. Гүлдер, жапырақтар, шөптер. 1 бөлім. (Жинақ)-М. –Стандарттар баспасы, 1994, 159б.

МЕМСТ 2237-75 Өсімдік шикізаты. Тамыры, жемісі, шикізат. 2 бөлім. (Жинақ)-М. – Стандарттар баспасы, 1994, 191б.

МЕМСТ 24027.0-80 Өсімдік шикізаты. Үлгіні жинау әдістері мен ережелері

МЕМСТ 24027.1-80 Өсімдік шикізаты. Шынайылығын, зиянды қосылыстармен уланбағандығын және құрамын зерттеу әдістері.

МЕМСТ 24027.2-80 Өсімдік шикізаты. Өсімдіктің ылғалдылығын, күлінің құрамын, экстрактивт, тері илегіш заттарды, эфир майларын анықтау әдістер. Дәрілік өсімдік шикізаты - талдау.

МЕМСТ 42-3-84 Өсімдік шикізаты және сақтау ұзақтылығын қадағалау. Өсімдік шикізаты - сапасын бақылау.

МЕМСТ 64-060-88 Өсімдік шикізаты, сақтау кезінде, темір жолмен тасығандағы және қайта өңдеу кезіндегі шығындар нормасы, нұсқаулар.

МЕМСТ 7.32-2001 Кітапханалық және баспалық мәліметтер бойынша стандарттар жүйесі. Ғылыми-зерттеу жұмыстары бойынша есеп беру. Жобалаудағы ережелер мен келтірулер.

МЕМСТ 6.38-90 Құжаттар жүйесін унифицикациялау. Құжаттарды реттеу талаптары.

МЕМСТ 7.1-84 Баспалық, кітапханалық және ақпараттық жүйеле бойынша стандарттар. Реферат және аннотация. Жалпы талаптар.

МЕМСТ 7.12-93 Баспалық, кітапханалық және ақпараттық жүйеле бойынша стандарттар. Кітапханалық жазбалар. Қазақ тіліндегі сөздерді қысқарту ережелері. Жалпы талаптар мен ережелер.

МЕМСТ 8.417-81 Өлшем бірліктерді реттейтін мемлкеттік жүйе. Физикалық өлшем бірліктер.

МЕМСТ 6709-72 Дистельденген су.

МЕМСТ 17299-78 Этил спирті. Техникалық жағдайлар.

МЕМСТ 1770-74 Тәжірибелік әйнек өлшеу ыдыстар. Цилиндрлер, мензуркалар, колбалар, пробиркалар. Жалпы техникалық шарттар.

МЕМСТ 25-2021-003-88 Зертханалық әйнек сынапты термометрлер.

АНЫҚТАМАЛАР, БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

Пайдаланатын анықтамалары бар терминдер:

Галофиттер – топырақтың белгілі дәрежеге дейін минералдануына төзе алатын өсімдіктер.

Climacoptera – *Алабұта* тұқымдасына жататын өсімдіктің туысы.

Биологиялық белсенді заттар деп – тірі ағзаға спецификалық әсері бар және дәрілік өсімдік шикізатының терапиялық эффектісін анықтайтын табиғи қосылыстарды айтады.

Амин қышқылдары – әр түрлі ақуыздардың молекулаларынан түзетін мономерлі заттар, сондықтан олар өте маңызды.

Май қышқылдары – карбон қышқылдары, жануарлар мен өсімдік ағзасында бос күйінде кездеседі және липидтердің құрамына кіргенде энергетикалық және пластикалық қасиет атқарады.

Эфир майлары – бұл өсімдіктер құрамында болатын және оларға тиісті хош иіс беріп тұратын ұшқыш заттырдың жалпы атауы.

Флавоноидтар – бензо-γ-пиронның туындылары, олардың спазматикалық, бактерияға қарсы, ісікке қарсы қасиеттері бар.

Хроматография – органикалық қоспаларды бір – бірінен бөлу және қоспа құрамын анықтау үшін қолданылатын әдіс.

Қағазды хроматография – көбінесе органикалық қоспаларды сапалық сраптауға қолданылатын әдіс.

[α] – айналу бұрышы

БКБ – биологиялық белсенді кешен

Glu – β-D- глюкоза

СГ – силикагель

ПА – полиамид

ЖҚХ (TLC) – жұқа қабатты хроматография

ПҚХ – препаративті қағазды хроматография

ПЖҚХ – препаративті жұқа қабатты хроматография

ЖЭСХ (HPLC) – жоғары эффективті сұйықтық хроматография

GC-Mass – Газды хроматография- Масс спектроскопиясы

RP-18 – айналмалы фаза

КПК – ортадан тепкіш бөлу хроматографиясы

Sephadex LH-20 – Сефадекс LH-20

КІРІСПЕ

Өсімдіктердің химиялық құрамын талдау медицинаны тиімді дәрі-дәрмектермен қамтамасыз етумен қатар, жаңа экологиялық таза, улылығы төмен және жоғары эффективті отандық фитопрепараттарды өндіру маңызды мәселе болып саналады. Қазақстанға өзге елдерден дәрілік заттар көп келеді, солардың біздің елге келуін азайту және оларға бәсекелес болу мақсатында Қазақстан фармацевтикасын дамыту үшін дәрілік өсімдіктердің химиялық құрамын толығымен зерттеп, олардың негізінде фитопрепараттар жасап, өндіріске енгізу қажет.

Сондықтан өсімдік тектес жаңа фармацевтикалық заттарды алу және өндірісте өндіруді ұйымдастыру биоорганикалық және фармацевтикалық ғылымдарда маңызды мәселелердің бірі болып табылады.

Өсімдік құрамында кездесетін органикалық қосылыстарды екі түрге бөлуге болады. Олар бірінші және екінші ретте синтезделетін заттар.

- Бірінші ретте синтезделетін заттар: ақуыздар, көмірсулар, липидтер, ферменттер, және витаминдер.
- Екінші ретте синтезделетін заттарды үлкен үш класқа бөлуге болады: фенолды қосылыстар, алкалоидтар, терпендер немесе терпеноидтар. Олардың бәрі зат алмасуға қатысады және де өсімдіктегі өзіне қатысты функцияларды ақтқарады.

Ақуыздарды тазартудың жолдары мен әдістерінің дамуы биотехнологияның прогресі үшін қажетті алғышарт болып табылады. Ақуызды табысты және тиімді тазалау - бұл ең қолайлы техникаларды таңдау және оларды шығымды көбейтіп, қадамдар санын азайтатын біртұтас логикалық жолға біріктіру. Тазарту стратегияларының көпшілігі хроматографияның қандай да бір формаларын қамтиды. Нәтижесінде хроматография ақуыз тазалауды қажет ететін әрбір зертханада маңызды құралға айналды. Селективтілігі әртүрлі хроматографияның әдістері кез келген биомолекуланы тазалау үшін қуатты комбинация құруы мүмкін.

Хроматографиялық әдіс 1903 жылы орыс ғалымы М.С. Цвет ұсынған. Ол былай деп жазды: «Аралас ерітіндіні адсорбент бағанасы арқылы сүзгенде пигменттер жекелеген, әртүрлі боялған аймақтарға бөлінеді. Спектрдегі жарық сәулелері сияқты күрделі пигменттің түрлі компоненттері адсорбент бағанасында бірінен кейін бірі бөлінеді және сапалық анықтауға мүмкіндік береді. Мұндай түсті препаратты хроматограмма, ал тиісті талдау әдісін хроматографиялық деп атаған». М.С. Цветтің жұмыстары хроматографияның басқа түрлерінің дамуына негіз болды.

Соңғы 30-40 жылдары аналитикалық қуатты құрылғылардың арқасында өсімдіктер мен жануарлардың химиялық табиғаты және бізді қоршаған физикалық әлем туралы білім деңгейіміз тереңдетілді. Кең қолданылатын заманауи әдістердің сезімталдығы жоғары, сондықтан көзбен көруге мүмкін емес, 1 мкг мөлшердегі затты идентификациялауға және оңай тіркеуге болады. Барлық аспаптық әдіс салыстырмалы жақсы белгіленген физикалық және химиялық заңдарға негізделген.

Көптеген талданған үлгілер қоспа болып табылады. Қызығушылық тудыратын қосылыстарды бөлу үшін, үлгі дайындаудың тиімді әдісін қолданған жағдайда қоспаға талдау жасау керек. Газды және сұйық хроматографияның мәні: олардың қоспа компоненттерін бөлу мүмкіндігі. Үлгіде мөлшері шамамен 10^{-12} болса да, газды хроматография мен масс-спектрометрияның үйлесуі арқылы күрделі үшжүзкомпонентті қоспаны бөлуге және анықтауға болады. Әсер ететін мүмкіндікке қарамастан, екі әдіс бойынша физикалық қағидалар қарапайым.

Хромато – Масс – Спектрометрия – талдаудың гибридті әдісі, сондықтан оны хроматография (газ және сұйық) және масс-спектрометрияның бірге үйлесуі ретінде қарастырылуы керек. Бөлу және талдау әдісі бір-біріне тәуелсіз жүзеге асады.

1. ХРОМАТОГРАФИЯНЫҢ НЕГІЗГІ ЕРЕЖЕЛЕРІ

Хроматография - заттарды бөлу және анықтау әдісі. Ол екі фазаның арасында жылжымалы және қозғалмайтын компоненттерді бөлуге негізделген. Қозғалмайтын (стационарлық) фаза қатты кеуекті зат болып табылады, ол сорбент немесе қатты затқа жағылған сұйықтық пленкасы деп аталады. Жылжымалы фаза қозғалмайтын фаза (кейде қысым астында) арқылы өтетін сұйықтық немесе газ.

Талданатын қоспаның компоненттері (сорбаттар) жылжымалы фазамен бірге стационарлық фазаның бойымен қозғалады. Қозғалмайтын фаза әдетте колонка деп аталатын түтікке салынады. Сорбент бетімен өзара әрекеттесу күшіне байланысты (адсорбция немесе қандай да бір басқа механизм есебінен) компоненттер колонкасының бойымен әртүрлі жылдамдықпен қозғалатын болады. Бір компоненттер сорбенттің жоғарғы қабатында қалады, басқалары аз дәрежеде сорбентпен өзара әрекеттесетін колонканың төменгі бөлігінде болады, ал кейбіреулері жылжымалы фазамен бірге колонкадан шығады (мұндай компоненттер ұсталмайтын деп аталады, ал оларды ұстау уақыты колонканың "өлі уақытын" анықтайды). Осылайша компоненттердің күрделі қоспаларының тез бөлінуі жүреді. Хроматографиялық әдістердің келесі артықшылықтарын атап өткен жөн:

1. Бөлу динамикалық сипатта болады, бұл ретте бөлінетін компоненттердің сорбция - десорбция актілері бірнеше рет қайталанады. Бұл сорбция және экстракция статикалық әдстерімен салыстырғанда хроматографиялық бөлінудің айтарлықтай үлкен тиімділігі.

2. Бөлу кезінде сорбаттар мен қозғалмайтын фазалардың өзара әрекеттесуінің әр түрлі типтері: таза физикалықтан хемосорбционды фазаға дейін қолданылады. Бұл заттардың кең шеңбері селективтік бөлу мүмкіндігін тудырады.

3. Бөлінетін заттарға әртүрлі қосымша өрістер (гравитациялық, электрлік, магниттік және т.б.) салуға болады, ол бөлу шарттарын өзгертіп, хроматография мүмкіндіктерін кеңейтеді.

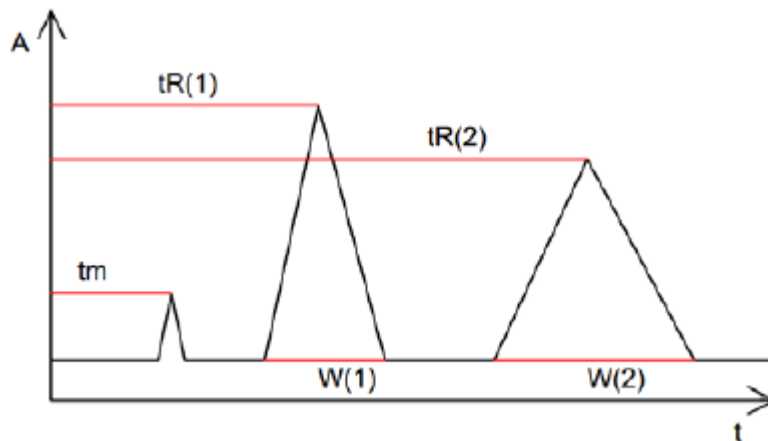
4. Хроматография - бір мезгілде бірнеше компоненттерді бөлуді және айқындауды үйлестіретін гибридті әдіс.

5. Хроматография аналитикалық есептерді (бөлу, сәйкестендіру, анықтау), сондай-ақ препараттық есептерді (тазалау, бөліну, шоғырландыру) шешуге мүмкіндік береді. Осы есептерді шешу оларды "on line" режимінде орындай отырып үйлестіруге болады.

Көптеген әдістер фазалардың агрегаттық жағдайы, бөлу механизмі және бөлу техникасы бойынша жіктеледі. Хроматографиялық әдістер фронтальды ығыстырғыш және элюентті бөлу процесін жүргізу тәсілі бойынша да ерекшеленеді. Аналитикалық есептерді шешу үшін элюенттік әдіс қолданылады, ол келесі қасиеттерге ие:

- сорбаттар аймақтары элюент аймақтарымен бөлінген болғандықтан, неғұрлым толық бөлуді береді;
- сорбент үздіксіз регенерацияланады;
- ұстау параметрлері жақсы жаңғыртылады

Аспаптың сигналының (ординат осі) жылжымалы фазаның уақытына немесе көлеміне (абцисс осі) тәуелділігі болып табылатын элюентті хроматограмма бөлінетін компоненттердің шыңдарының жиынтығы болып табылады. Әдетте жеке пик-гаусс қисық сызығын білдіреді. Типтік хроматограмма 1-суретте көрсетілген.



1 сурет - Екі зат қоспасының хроматограммасы.

Колонкадағы заттың тәртібін сипаттайтын негізгі хроматографиялық параметрлерді қарастырайық. Талданатын сынаманы енгізу сәтінен бастап хроматографиялық шыңның максимумын тіркеу сәтіне дейінгі уақытты - ұстап тұру уақыты деп атайды және t_R белгілейді. Ұстап қалу уақыты екі құрамдастан тұрады - заттардың жылжымалы фазада (t_m) болу уақытымен және қозғалмайтын фазада болу уақыты. t_m мәні шын мәнінде сіңірілмейтін компоненттің хроматографы арқылы өту уақытына тең. t_R мәні колонкаға енгізілетін сынама санына байланысты емес, бірақ заттың және сорбенттің табиғатына (егер заттың сорбция изотермасы сызықтық болса), сондай-ақ сорбенттің қаптамасына байланысты және колонкадан колонкаға өзгеруі мүмкін. Сондықтан колонканың нақты ұстау қабілетін сипаттау үшін түзетілген ұстау уақытын енгізу керек (t_R)

$$t'R = t_R - t_m \quad (1)$$

Ұстап тұруды сипаттау үшін жиі ұстап тұратын көлем қолданылады - V_R – затты элюирлеу үшін белгілі бір жылдамдықпен баған арқылы өткізу қажет жылжымалы фазаның көлемі:

$$V_R = F \cdot t_R \quad (2)$$

мұндағы F – жылжымалы фаза ағынының көлемді жылдамдығы ($\text{см}^3/\text{с}$) немесе (мл/мин).

Алынған хроматограммасы бойынша (1-сурет) хроматографиялық параметрлердің тәжірибелік мәнін есептеуге болады (ұстап қалу факторы (сыйымдылық) (k), селективтілік коэффициенті (α), рұқсат (R_s)) және хроматографиялық колонканың тиімділігін бағалауға болады.

Ұстап қалу факторы зат қозғалысқа қарағанда қозғалмайтын фазада қанша есе ұзағырақ екенін көрсетеді. Хроматографиялық бөліну шартын осы шама 1,5-тен 4к-ке дейін болатындай етіп таңдауға тырысады, оны мына формула бойынша есептейді:

$$K = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

Хроматографиялық шыңдардың максимумдарының арасындағы қашықтық қозғалмайтын фазаның іріктелуін анықтайды. Бөліну факторы (селективтілік коэффициенті) α екі бөлінетін заттардың салыстырмалы ұстап қалу немесе салыстырмалы қозғалу өлшемі бар және теңдеумен сипатталады:

$$\alpha \equiv t_{R2}/t_{R1} = D_2/D_1 \quad (4)$$

Екі элементті бөліп алу үшін бөлу шарттарын таңдау қажет

$$D_1 \neq D_2 \text{ және } \alpha > 1,00$$

Хроматографиялық шыңды жою дәрежесі колонканың тиімділігін анықтайды. Колонка неғұрлым тиімді болса, соғұрлым жоғары мөлшерде компоненттерді қысқа уақытта бөлуге болады, яғни талдау уақыты қысқарады.

Колонканың сандық тиімділігі N теориялық тәрелкелер санымен көрсетілуі мүмкін. Теориялық тәрелкелердің тұжырымдамасына сәйкес хроматографиялық колонка қозғалмайтын және жылжымалы фазалар арасындағы тепе-теңдік бірден орнатылатын дискретті, жанасатын көлденең қабаттардың қатары ретінде және заттың сорбция-десорбция актісі әр қабатта бірнеше рет қайталанады. Қабат биіктігі-теориялық тәрелке баламалы биіктік, H арқылы белгіленеді. Параметрлер арасында қатынасы бар:

$$H = L/N \quad (5)$$

мұнда L - колонканың ұзындығы.

H , аз болған сайын, колонканың осы ұзындығы кезінде фазалар арасындағы тепе-теңдік неғұрлым көп рет қойылса, соғұрлым талданатын қоспа компоненттерінің бөлінуі тиімді. Эксперименттік деректерден N мынадай формула бойынша есептеледі:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (6)$$

мұнда W -негіздегі шыңның ені.

Екі көрші шыңдарды бөлу R_s рұқсатымен сипатталады. Рұқсат екі заттың толық бөлінуінің өлшемі болып табылады. R_s тең немесе 1,5 артық болса, бөлу толық болып саналады.

Хроматографиялық колонканың негізгі параметрлерінің (тиімділігі, селективтілігі және ұстап қалу коэффициенттері) хроматографиялық шыңдарды шешуге жиынтық әсері теңдеумен сипатталады:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \quad (7)$$

Осылайша, компоненттерді бөлу толықтығы D , R_s , H және L функциясы болып табылады. Талданатын қоспаның хроматограммасын алу оның сапалық және сандық құрамын анықтауға мүмкіндік береді. Анықталатын заттардың сапалық сипаттамасы олардың ұстап қалу уақыты (ұстап қалу көлемі) және ұстап қалудың басқа да сипаттамалары (t_R , V_R , k , ұстап қалу индекстері) болып табылады. Сәйкестендіру мақсаттары үшін гомологиялық қатардағы қосылыстардың кейбір физикалық-химиялық қасиеттерімен (мысалы, метилендік топтардың санымен, қайнау температурасымен) ұстау параметрлерінің корреляциялық тәуелділіктері де қолданылады.

Хроматографиялық шыңдардың аудандары мен биіктіктерін салыстыру қоспаның сандық құрамын бағалауға мүмкіндік береді. Хроматографияда сандық талдаудың үш негізгі әдісі қолданылады.

Абсолюттік калибрлеу әдісі әдетте стандартты қоспалар бойынша градуирлеу графигін басқа да физикалық әдістермен құруды көздейді.

Ішкі қалыпқа келтіру әдістерінде қоспаның барлық ықтимал компоненттерінің шыңдары хроматограммада тіркелген және олардың аудандарының (S) сомасы 100% тең деп болжанады.

Детектордың әртүрлі компоненттерге сезімталдығындағы айырмашылықтар түзету коэффициенттерін (K_i) енгізумен ескеріледі. Есеп мынадай формула бойынша жүргізіледі:

$$X(\%) = \frac{S_i \cdot K_i}{\sum_{i=0}^n (S_i \cdot K_i)} \quad (8)$$

мұндағы n – қоспа компоненттерінің саны, S – хроматографиялық шыңның ауданы, K_i – әрбір i -компонент үшін түзету коэффициенттері.

Ішкі стандартты әдіс - белгілі мөлшерде сынама қосылысын талданатын үлгіге енгізуді қарастырады, алынған қоспаның хроматографиясын және есебін келесі формуламен есептейді:

$$C_i(\%) = \frac{S_i}{S_{st}} K c_{st} \quad (9)$$

ондағы C_{st} – үлгіге енгізілген ішкі стандартты концентрациясы, k – сынама қосылысын стандартты қоспа арқылы есептейтін түзету факторы.

Тақырыпты пысықтауға арналған сұрақтар:

1. Хроматография мағынасын түсіндіріңіз?
2. Хроматографиялық талдау әдісінің негізін түсіндіру?
3. Хроматографиялық әдістің қоспаларды бөлудегі артықшылығы?
4. Қозғалмалы және қозғаламайтын фазалардың табиғатына байланысты хроматографиялық әдістердің түрлерін түсіндіру?
5. Хроматографиялау процесінің жүру тәсіліне байланысты хроматографиялық әдістердің түрлерін түсіндіру?

2. АҚУЫЗДАРДЫ ТАЗАЛАУДАҒЫ ЖҮРГІЗЕТІН ХРОМАТОГРАФИЯЛЫҚ СТАНДАРТТЫ ШАРТТАРЫ МЕН ҚАҒИДАЛАРЫ

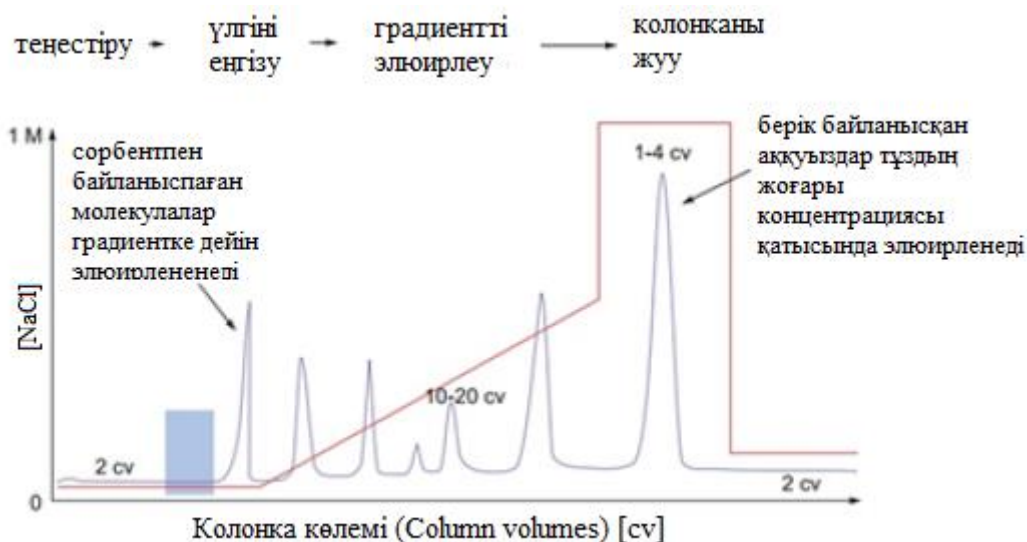
2.1 Иондық алмасу хроматографиясы

Иондық алмасу хроматографиясы (ИАХ) - иондар мен полярлы молекулалардың олардың зарядталуына қарай бөлінуіне мүмкіндік беретін әдіс. Ол ірі ақуыздарды, кішкене нуклеотидтер және аминқышқылдар сияқты кез-келген зарядталған молекуланы іс жүзінде бөліп алу үшін пайдаланылуы мүмкін. Сынаманың және сорбенттің өзара әрекеті Кулонның өзара әрекеттесуіне негізделген. Сорбент бетінде иондардың функционалдық топтарына ие, олар керісінше зарядтың аналитінің ионымен өзара әрекеттеседі. Сорбенттің теріс зарядталған топтары оң зарядталған аналитпен байланысатын хроматографияның түрі катион алмасу деп аталады. Егер теріс зарядталған аналитті байланыстыру үшін оң зарядталған сорбент пайдаланылса, онда анион алмасу хроматографиясы қолданылады. Иондық алмасу хроматографиясының түрін таңдағанда, ақуыздың pI (егер белгілі болса) изоэлектрлік нүктесі басшылыққа алынады, pH мәні жоғары болса, pI ақуыз теріс зарядты алады, егер кем болса, оң болады.

Ақуыздарда оң және теріс зарядтар бола алатын көптеген функционалдық топтар бар. Иондық алмасу хроматографиясы кезінде ақуыздар олардың жалпы зарядтары бойынша бөлінеді. Бөлу pH немесе жылжымалы фаза иондарының

концентрациясының өзгеруімен жүзеге асырылады. Өзгерістерді кезеңді немесе үздіксіз градиентпен енгізеді. Көбінесе, үлгілер тұз градиенті (NaCl) арқылы элюирленеді.

Мысалы, егер ақуыз рН = 7 мәнінде теріс зарядты болса, онда ол оң зарядталған сорбентпен байланысты болады, сол екі арада оң зарядталған ақуыздар элюент ағынымен жуылады (элюирленеді). рН мәнін төмендеткенде ақуыз артып жатқан оң зарядқа ие болады және, ақыр соңында, элюирленіп, хроматограммада УК сіңіру (2-сурет) шыңын береді.



2 сурет - Ионалмастырушы бөлудің типтік хроматограммасы

Ионды алмастырғышты таңдау

Көптеген жағдайларда кең рН диапазонында жұмыс істеуге мүмкіндік беретін күшті иондық алмастырғышты қолдану арқылы тазалауды бастау ұсынылады.

Күшті ион алмастырғыштар:

Q (анион алмастырғыш), S және SP (катионды алмастырғыштар) кең рН диапазонында (2-12) толығымен зарядталады.

Әлсіз ион алмастырғыштар:

DEAE (анион алмастырғыш) және CM (катион алмастырғыш) толығымен тар рН диапазонында (тиісінше 2-9 және 6-10) толығымен зарядталған, бірақ тазалау кезінде қосымша талғамдылықты береді.

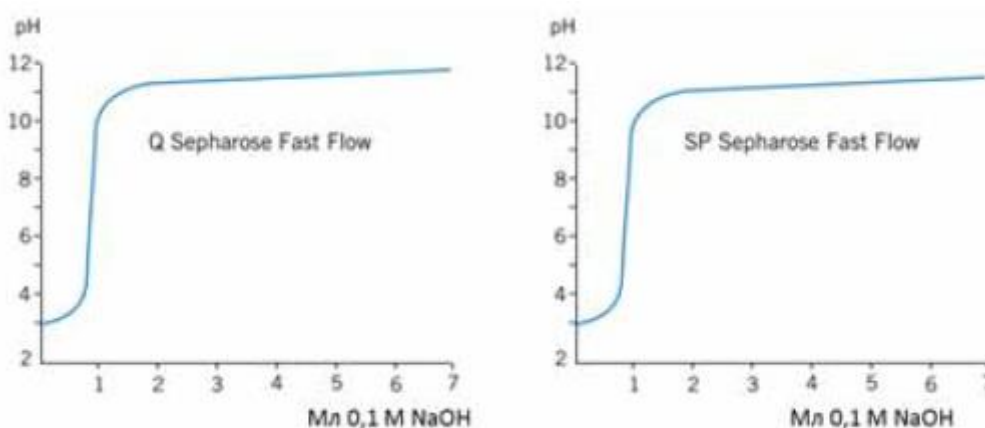
Функционалдық топтар

Иондық алмасу матрицаларында қолданылатын функционалдық топтар 1-кестеде келтірілген. Ион алмастырғыштың күші немесе әлсіздігі

функционалдық топтардың иондалуы рН-мен өзгереді дәрежеге қатысты болады. Бірақ функционалдық топтардың белоктармен байланысатын күшіне қатысты емес. Күшті ион алмастырғыштар рН мәнінің өзгеруі кезінде протондарды қоспайды және жоғалтпайды, сондықтан буферлік қабілеті жоқ, рН-тың кең диапозонда толығымен зарядталған болып қалады (3-сурет).

1 кесте - Ион алмастырғыш сорбенттерде қолданылатын функционалдық топтар

АНИОН АЛМАСТЫРҒЫШТАР		Функционалдық топтар
Quaternary ammonium (Q)	күшті	$-O-CH_2N^+(CH_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)	әлсіз	$-O-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)	әлсіз	$-O-CH_2CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
КАТИОН АЛМАСТЫРҒЫШТАР		Функционалдық топтар
Sulfopropyl (SP)	күшті	$-O-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$
Methyl sulfonate (S)	күшті	$-O-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$
Carboxymethyl (CM)	әлсіз	$-O-CH_2COO^-$

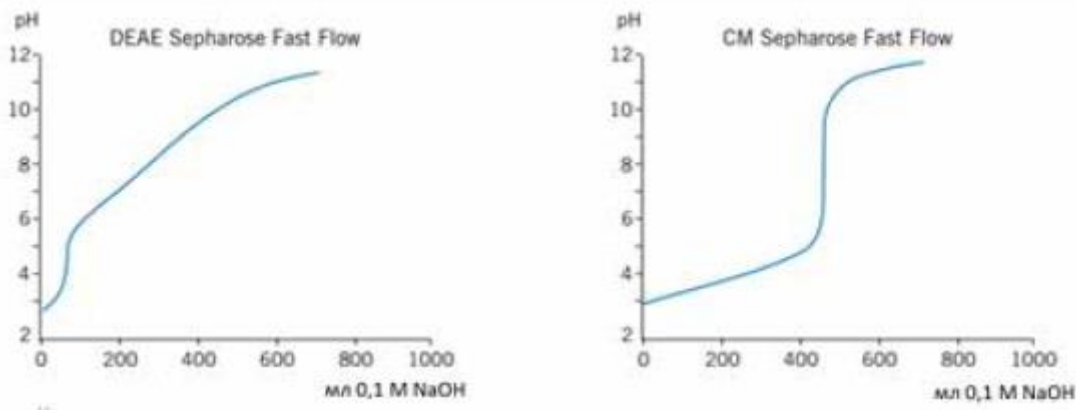


3 сурет - Q Sepharose және SP Sepharose күшті ион алмастырғыштардың титрлеу қисықтары.

Күшті ионды алмастырғыштармен жұмыс істеудің бірнеше артықшылықтары бар:

- Өзара әрекеттесу механизмі қарапайым, өйткені зарядтың өзара әрекеттесуінің аралық формалары жоқ
- Байланыстыру мүмкіндігі жоғары және төменгі рН мәнінде сақталады
- Тазалау протоколын жеңіл әзірлеу және оңтайландыру

Көптеген ақуыздар 5,5-тен 7,5 дейінгі шекарада изоэлектрлік нүктелерге ие және кез келген әлсіз немесе күшті иондық алмастырғыштарда бөлініп кетуі мүмкін. Әлсіз ион алмастырғыштардың артықшылығы - күшті ион алмастырғыштармен салыстырғанда әртүрлі селективтілікті береді. Олардың кемшілігі - рН мәніне байланысты протондарды қосып және берумен ион алмастыру сыйымдылығын өзгертеді (4-сурет).



4 сурет - DEAE Sepharose және CM Sepharose әлсіз ион алмастырғыштардың титрлеу қисықтары.

Сорбентті таңдау

Сорбент таңдағанда тазалау шкаласы, бөліну жылдамдығы, ажыратымдылық, сорбенттің байланыстыру қабілеті және үлгілердің тұрақтылығы сияқты параметрлер ескерілуі керек.

Үлгілерді дайындау

Үлгілерді дұрыс дайындау жақсы ажыратымдылықты береді және бағананың қызмет ету мерзімін ұзартады. Тиімді байланыстыру үшін, үлгілер бастапқы буфер сияқты бірдей рН-қа және иондық күшке ие болуы керек. Үлгілер қатты бөлшектерден, әсіресе 34 мкм немесе одан кем диаметрі бар моншақтармен жұмыс істегенде, бос болуы керек. Бағанаға жүктелген ақуыздың жалпы саны бағананың жалпы байланыс сыйымдылығынан аспауы керек. Градиентті элюирлеумен оңтайлы бөлу үшін бағананың жалпы байланыс сыйымдылығының шамамен бестен бірін пайдаланыңыз.

Бағананы дайындау

Әдістемені оңтайландыру, сондай-ақ, тазалау жылдамдығын және тиімділігін арттыру үшін кішігірім дайын бағаналарды пайдаланыңыз. Бағананы өзіңіз толтыруды шешсеңіз, келесі ережелерді орындаңыз:

Бағана өлшемі = Әдетте гель қабаты 5-15 см болады.

Гель мөлшері = Үлгіні байлау үшін қажетті гелдің мөлшерін есептеңіз және бағананы толтыру үшін бес есе артық пайдаланыңыз.

Толық ақпарат алу үшін әрбір нақты сорбент үшін жеке нұсқауларды қараңыз.

Буферді дайындау

Бөтен қоспалар мен қосылыстары жоқ тазартылған су мен реагенттерді пайдаланыңыз. Буферді 0,45 немесе 0,22 мкм сүзгісінен сүзіп жіберіңіз және ажыратымдылыққа айтарлықтай әсер ететін көпіршіктердің жоғына көз жеткізіңіз. Буфердің иондары таңдалған сорбент сияқты рН мәнінен $pK_a \pm 0,6$ рН бірліктерінің мәнімен жұмыс істейтін бірдей зарядқа ие болуы керек. Егер белгілі болса, рІ нүктесінен 0,5-1 бірлікке жоғары рН мәнін таңдаңыз. Буфердің концентрациясы буферлік сыйымдылықты және іріктеу кезінде тұрақты рН деңгейін сақтау үшін және тұз градиенті қолданылған кезде жеткілікті болуы керек.

рІ белгісіз болған үлгілермен жұмыс жасағанда, мына жағдайларды қолданыңыз:

Анион алмастырғыш

Градиент 0-100%: В буферінің 10-20 көлемі

Бастапқы буфер А: 20 mM Tris-HCl, рН 8,0

Элюирлеуші буфер В: 20 mM Tris-HCl + 1M NaCl, рН 8,0

Катионды алмастырғыш

Градиент 0-100%: В буферінің 10-20 көлемі

Алғашқы буфер А: 20 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, рН 6,8

Элюирлеуші буфер В: 20 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ + 1M NaCl, рН 6,8

Бағаналарды тазалау және сақтау

Ұсынылған сақтау шарттары бағана нұсқауларында сипатталған. Әдетте бұл 4°C температурадағы 20% этанол.

2.2 Гидрофобты өзара әрекеттесу хроматографиясы

Гидрофобты хроматография (ГХ) - ақуыздардың гидрофобтық қасиетіне негізделген бөлу әдісі болып табылады. Беттегі гидрофобты аминқышқылдары бар ақуыздар сорбенттің (фенил, октил, бутил және т.б.) гидрофобтық топтарына кері байланысуы мүмкін. Үлкен иондық күші бар буфердегі үлгі (мысалы, 1,5 М аммоний сульфаты) сорбентпен байланысады. Бұл өзара әрекеттесу буфердің жоғары иондық күші арқасында күшейтіледі, сондықтан ГХ - ИАХ кезіндегі ақуызды аммоний сульфатымен тұндыру немесе тұзбен элюирлеуден кейінгі мінсіз «келесі қадам». Екі жағдайда да үлгіде жоғары тұз концентрациясы болады және оны қосымша дайындықсыз ГХ арқылы бөлуге

болады. Сорбентпен байланыстырғаннан кейінгі жағдайлар өзгеріп тұрғанына байланысты заттар өзгереді. Элюирлену тұз концентрациясын азайту арқылы жүргізіледі (5-сурет). Тұз градиентін біртіндеп немесе үздіксіз азайту арқылы өзгерістерді енгізеді. Этиленгликоль градиенті, хаотропты агенттер (мочевина, гуанидин хлориді және т.б.) және детергенттерді қосу немесе рН пен температураның өзгеруі сияқты басқа элюция түрлері де қолданылуы мүмкін.

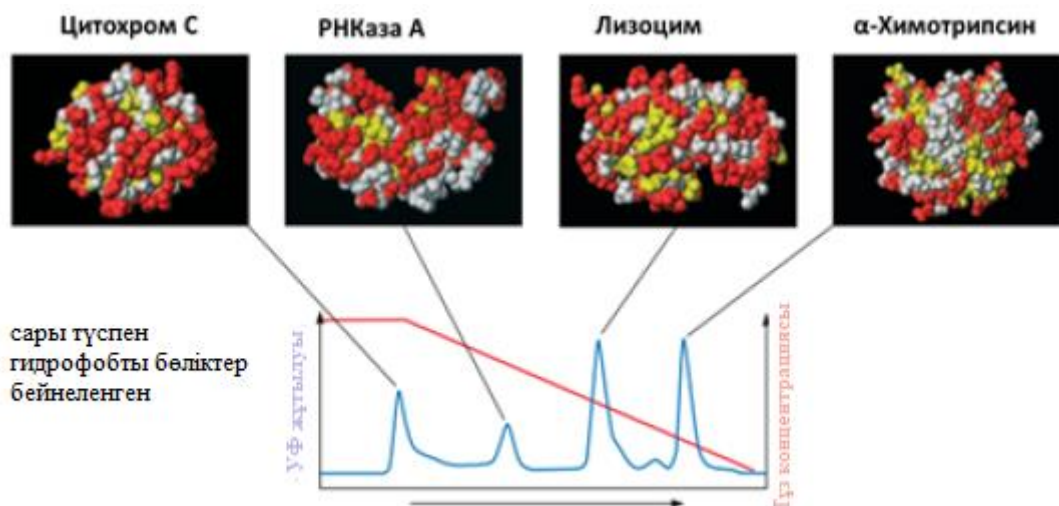


5 сурет- Гидрофобты бөлудің типтік хроматограммасы.

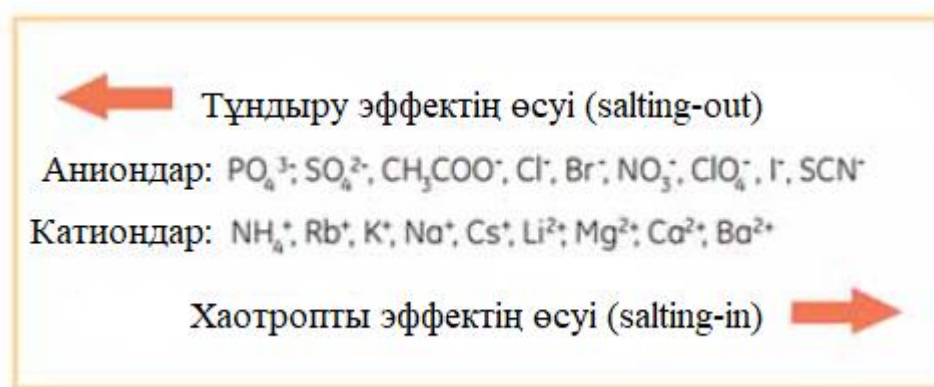
6-суретте ГХ-мен стандартты ақуыздардың қалай бөлінуі мүмкін екендігі көрсетілген. Бұл мысалда барлық ақуыздар сорбенттің гидрофобты бетімен өзара әрекеттеседі. Буфердің иондық күші азайған сайын, байланыс әлсіреп, бірінші кезекте ең төменгі гидрофобия дәрежесі бар ақуыздар элюирленеді. Ең гидрофобты ақуыздар соңғы кезекте элюирленеді.

Гидрофобты хроматографияға арналған сорбенттер сфералық форманың инертті матрицасымен байланысы бар алкил немесе арил топтары бар лигандадан тұрады. Матрицада ішкі беттің ұлғаюы үшін қуыстар болады.

ГХ қолданған кезде белгілі бір тұздардың ақуыздардың гидрофобты өзара әрекеттесуіне әсер ету мүмкіндігін ескеру қажет. Иондардың ақуыздарды элюирлеу немесе тұндыру қабілеті Гоффмайстердің қатарынан көрінеді (7-сурет). Жоғары зарядталған шағын иондар күшті «тұндырғыштар» болып табылады, ал органикалық қышқылдар мен негіздер ерігіштігін арттырады және ерітіндідегі ақуыздарды тұрақтандырады. Натрий, калий, аммоний және сульфаттардың тұздары күшті тұндыру агенттері болып табылады және белоктарға тұрақтандырушы әсер етеді. Сондықтан ең көп пайдаланылатын тұздар – аммоний сульфаты, аммоний сульфиті, натрий хлориді, калий хлориді және аммоний ацетаты болып табылады.



6 сурет - Ақуыз молекулаларының олардың гидрофобты аймақтарының бетіне байланысты бөлінуі (сары түспен гидрофобты аминқышқылдары көрсетілген, қызыл-гидрофильді)



7 сурет - Гофмейстер қатары, белоктардың ерігіштігіне кейбір иондардың әсерін көрсетеді.

Гидрофобты сорбенттерге байланған ақуыздың мөлшері белгілі бір тұз концентрациясына сызықты түрде артады. Содан кейін тұз концентрациясының одан әрі артуымен, сан мөлшері экспоненталдық түрде өседі. Егер ақуыз тұрақсыз болса немесе оның тұрақтылығы белгісіз болса, онда байланыстырылған ақуыздың мөлшері тұз концентрациясымен сызықты түрде өсетін аймақта ақуызды байланыстыру ең қолайлы.

Гидрофобты сорбенттерді таңдау

Лиганда негізінен сорбенттің гидрофобтығын айтарлықтай дәрежеде анықтаса да, матрица соңғы селективтіке де әсер етуі мүмкін. Гидрофобты хроматографияға арналған матрицалар - экстремалды тазалау жағдайларына физикалық және химиялық тұрғыдан төзімді кеуекті инертті материалдар.

Кеуекті және бөлшектердің мөлшері арасындағы оңтайлы баланс үлкен беттік аймақты білдіреді, сондықтан жоғары байланыстыру қабілеттілігін қамтамасыз етеді. Сондай-ақ, ашық кеуекті құрылымымен жоғары кеуектілік байланыстыру қабілетіне зақым келтірместен ағынның жылдамдығын арттыруға мүмкіндік береді. Матрицаның инерттілігі үлгілермен ерекше емес өзара әрекеттестікті төмендетеді. Жоғары физикалық тұрақтылық тұз концентрациясының күрт өзгеруіне және рН деңгейіне қарамастан, жаңғыртылуды жақсарта отырып, сорбенттің көлемінің тұрақты болуын қамтамасыз етеді. Жоғары химиялық тұрақтылық колонканы агрессивті тазартқыш құралдармен тазалауға мүмкіндік береді. Қазіргі сорбенттер химиялық және физикалық тұрақты полимерлі немесе агарозды матрицалар негізінде жасалады (2-кесте).

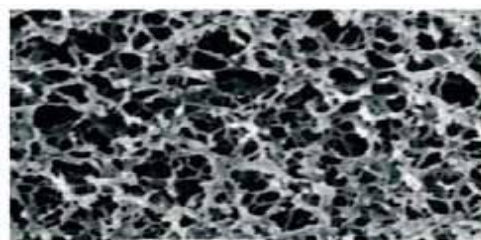
2 кесте - “GE healthcare” компаниясының гидрофобты матрицасы

Матрица	Материал	Бөлшектердің орташа розмірі
SOURCE 15	Полистирол/дивинилбензол	15 мкм
Sepharose High Performance	Агароза 6%	34 мкм
Sepharose 6 Fast Flow	Агароза 4%	90 мкм
Sepharose 4 Fast Flow	Агароза 4%	90 мкм

SOURCE™ матрица сауда белгісі полистирол / дивинилбензолдан жасалынған және жоғары ағындық жылдамдықта жоғарғы ажыратымдылықты қамтамасыз ететін сфералық (монодисперсті) шағын (15 мкм) бөлшектер (8-сурет) болып табылады. Sepharose™ коммерциялық атауларындағы матрицалар әртүрлі дәрежелі тізбек аралық қусырулармен агарозаның гидрофильді тізбектері болып табылады (9-сурет). Ең қолайлы матрица тиісті ағынның жылдамдығына, шешілу дәрежесіне және байланыстыру қабілетіне сәйкес таңдалады. Мысалы, Sepharose 34 мкм градиентті элюирлену жоғары ажыратылымдылықты қамтамасыз етеді, ал 90 мкм-ден астам Sepharose бөлшектері үлкенірек көлемге ие және жоғары ағын жылдамдығына қолайлы.



8 сурет- SOURCE™ электрондық



9 сурет- Көлденең - тігілген агароздың құрылымы (Sepharose™).

Ең гидрофобты ақуыздар гидрофобиялық лигандамен өте қатты байланысады және хаотропты заттар немесе жуғыш заттар сияқты элюирлеудің төтенше шарттарын талап етуі мүмкін. Сондықтан төмен гидрофобтығы бар сорбенттерден бастау керек. Тұздың өте төмен концентрациясында неғұрлым жоғары ажыратымдылық пен жоғары сыйымдылық беретін сорбентті таңдаңыз. Әдетте, лигандтардың ақуызбен байланысу күші келесі қатар бойынша артады: эфир, изопропил, бутил, октил, фенил. Дегенмен, байланысу ерекшелігі, селективтілік және өзара әрекеттесудің төзімділігі түрленуі мүмкін және әр жағдайда тексерілуі керек. Ең кең тараған гидрофобтық лигандар 3-кестеде келтірілген. Жалпы, гидрофобты хроматографияға арналған сорбенттер үлгінің құрамдас бөліктерімен өзара әрекеттесу сипатына қарай екі топқа бөлінеді. Тікелей алкилді тізбектер (бутил, октил, эфир, изопропил) тек гидрофобты қасиеттерді көрсетеді, ал арилді лиганд (фенил) ароматты да және гидрофобты да қасиеттерге ие.

3 кесте - Гидрофобты хроматографияда қолданылатын гидрофобты лигандтар

Фенил	$-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$	Октил	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$
Бутил-S	$-\text{S}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$	Эфир	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$
Бутил	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$	Изопропил	$-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Үлгілерді дайындау

Үлгілерді дұрыс дайындау сенімді шешімді қамтамасыз етеді және колоннаның жұмыс істеу мерзімін арттырады. Тиімді байланыстыру үшін бастапқы буфер ретінде үлгілер бірдей рН және иондық күш (мысалы, 1,5 М аммоний сульфаты немесе 4М NaCl) болуы керек. Үлгілер қатты бөлшектерден, әсіресе 34 мкм немесе одан кем диаметрі бар моншақтармен жұмыс істегенде, бос болуы керек. Колонға жүктелген ақуыздың жалпы саны колоннаның жалпы байланыс сыйымдылығынан аспауы керек. Градиентті элюирлеу кезінде оңтайлы бөлу үшін колоннаның жалпы байланыс сыйымдылығының шамамен бестен бірін пайдаланыңыз.

Бағаналарды дайындау

Әдісті оңтайландыру, сондай-ақ жылдамдықты және тазалаудың тиімділігін арттыру үшін кішігірім дайын бағандарды пайдаланыңыз.

Бағананы өзіңіз толтыруды шешсеңіз, келесі ережелерді орындаңыз:

Баған мөлшері = әдетте гельдік қабат 5-15 см.

Гель саны = үлгіні толтыру үшін қажетті гелдің мөлшерін есептеп, бағананы толтыру үшін бес есе көп пайдаланыңыз.

Толық ақпарат алу үшін әрбір нақты сорбент үшін жеке, нақты нұсқауларды қараңыз.

Буферді дайындау

Ақуыздың тұрақтылығы мен белсенділігімен үйлесімді рН-ты таңдаңыз. Буфердің концентрациясы үлгіні қондыру кезінде рН-ты сақтау және тұз концентрациясының өзгеруі кезінде жеткілікті болуы қажет.

Сипаттамалары сізге белгісіз үлгілермен жұмыс жасағанда, келесі шарттарды орындаңыз:

Градиент 0-100%: 10-20 т көлемі буферлік В;

Бастапқы буфер А: 50 мН натрий фосфаты, рН 7,0 + 1-1,5 М аммоний сульфаты;

Элюция буфері В: 50 мН натрий фосфаты, рН 7,0.

Бағандарды тазалау және сақтау

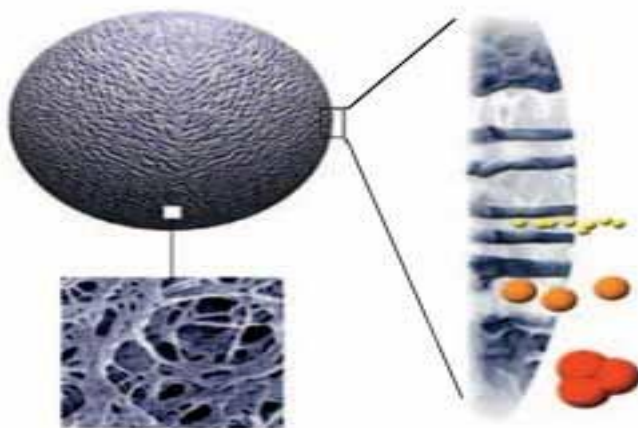
Ұсынылған сақтау шарттары бағана нұсқауларында сипатталған. Әдетте бұл 4°C температурада 20% этанол.

Гель-фильтрация

Гельді фильтрлеу (ГФ) немесе эксклюзивті хроматография (елеу, гельді ену, гельді фильтрлеу хроматографиясы) молекулалардың мөлшеріне қарай бөлу әдісі. Ион алмасу мен аффинды хроматографиясына қарағанда үлгі молекулалары сорбентпен байланыспайды, сондықтан буфердің құрамы әдістердің шешуші қабілетіне (шындар арасындағы аралыққа) әсер етпейді. Сондықтан ГФ-тің маңызды артықшылығы мынада, қоршаған ортаның жағдайы үлгінің типіне сәйкес өзгеруі мүмкін немесе тазалау мен сақтаудың кейінгі қадамдары үшін талаптар. ГФ рН өзгеруіне, металл иондарының концентрациясына, кофакторларға және басқа да қоршаған орта жағдайларына сезімтал биомолекулалар үшін өте қолайлы. Бөлуді қажетті иондардың, кофакторлардың, жуғыш заттардың, несепнәр, гуанидин гидрохлориді, жоғары немесе төменгі иондық күшінде, 37°C температурада немесе суықта, эксперимент жүргізу қажет болған жағдайда өткізуге болады. Заттардың молекулаларының қозғалмалы фазадан қозғалмайтын фазаға және кері диффузияға өтуі күрделі емес. Сорбенттің түйіршіктерінің ішінде басқа жағдай пайда болады. Мұнда диффузияланушы заттың молекулаларының кеңістіктік полимерлі желісінің немесе тесіктердің қабырғаларымен соқтығысуы арқылы диффузия көп немесе кем болып кетеді.

Егер молекулалардың өлшемдері түйіршіктегі каналдардың орташа диаметрімен салыстырылатын болса, онда бұл қиындықтар өте маңызды және диффузияға жол берілмейді. Сондай-ақ, түйіршіктердің ішкі көлемінің бір

бөлігі, яғни қозғалмайтын фаза көлемінің бөлігі (кейде бүкіл көлем) қозғалмалы фазада ерітілген заттың молекулаларына қол жетімсіз. Бастапқы заттар қоспасының әр түрлі құрамдас бөліктерінің молекулалары үшін қозғалмайтын фазаның көлемінің қолайлы дәрежесінің айырмашылығы оларды фракциялау мүмкіндігін анықтайтын фактор болып табылады. Әрине, ол молекулалардың өлшеміне сәйкес болады (10-сурет). Ірі түйіршіктерге еңбейтін ірі молекулалар, бағанадан бірінші болып шығады. Сол уақытта түйіршіктерге еркін таратылатын шағын молекулалар уақыт өте қозғалмайтын фазада қалады. Осылайша, барлық кішкентай молекулалар колонкадан бір мезгілде шығады және ірі молекулаларға қарағанда, арнайы кеш шығады. Молекулалардың мөлшері олардың массасына байланысты екені анық, бірақ түгелімен массасы арқылы анықталмайды. Бұл әсіресе полипептид немесе полинуклеотидті тізбектің орау тығыздығына байланысты болуы мүмкін макромолекулалар жағдайында өте маңызды. Түйіршіктер ішіндегі тесіктердің кеңістіктік торымен диффузия еркіндігін шектеу кезінде молекуланың пішіні маңызды рөл атқара алады. Әлбетте, сфералық глобула бір көлемдегі молекулаға қарағанда әртүрлі болады, бірақ таяқ түрінде ұзартылады.



10 сурет- Түйіршіктелген сорбенттің схемалық көрінісі және оның электронды жақындығы

Гельді фильтрлеу молекулалық салмақтарды, тазалаудың соңғы сатысында, тұзсыздандыру немесе буффердің жылдам өзгеруінде қолданылады. Типтік ГФ хроматограммасы 11-суретте көрсетілген.



11 сурет - Типтік ГХ хроматограмма

Сорбентті таңдау

Гельді фильтрациялауға арналған кеуекті материалдар көбінесе әртүрлі орташа мөлшері бар диаметрлер жиынтығының сфералық түйіршіктері түрінде шығарылады. Биополимерлердің, әсіресе ақуыздардың қоспаларын бөліп алу үшін гидрофильді полимерлі сорбенттерді (сефадекс, супердекстер - көлденең-тігілген декстрандар, сондай-ақ полиакриламид гелдері-сефакрил) немесе полисахарид модифицирленген макрокеуекті кремний гелдерін қолданыңыз. Олар әмбебап коммерциялық атаулармен аталады. 4-кестеде зерттелген ақуыз молекулаларының молекулалық массасына ГФ үшін сорбенттердің әртүрлі түрлерінің сәйкестігін бақылауға болатын схема көрсетілген. Қолданыстағы сорбенттердің көмегімен молекулалар массасын 100-ден 80 000 000-ға дейін бөлу мүмкіндігі бар. Бұл диапазонда пептидтер мен ірі ақуыздық кешендерді бөлуге болады. Сорбенттің селективтілігі тек қана кеуектердің мөлшері мен көлеміне байланысты және селективті қисық сызықпен сипатталады. Фракциялау диапазоны - сорбенттердің ішіне жартылай өтуге қабілетті молекулалық массалар диапазоны, яғни осы диапазондағы молекулалар жоғары ажыратымдылықпен бөлінуі мүмкін.

4-кестеде гельді фильтрацияда қолданылатын кейбір типтік тасымалдаушылар қарастырылған. Бұл тізім толық емес және көптеген басқа сорбенттердің материалдары бар. Сорбенттің материалы мен маркасын таңдау гельді фильтрация шарттарының нақты талаптарына байланысты. Sephacryl®, Sephadex®, Sepharose® және Superdex® GE Healthcare компаниясының тіркелген сауда белгілері болып табылады. Tosoh Bioscience-дан Sorbents Toyopearl® ГФ-де қолданылуы мүмкін. Полиметакрилаттан алынған сорбенттер түрлі молекулалық фракция ауқымдарына жарамды.

4 кесте- Гельді фильтрация үшін кейбір кең таралған сорбенттер

Сорбент Материалы	Колонка атауы ж/е молекулалардың фракциялануың диапазоны (глобулярлы ақуыздар, kDa)	Артықшылығы	Кемшілігі
Декстран	Sephadex G-10 0–700 Da Sephadex G-25 1–5 kDa Sephadex G-50 1.5–30 kDa Sephadex G-100 4–150 kDa Sephadex G-200 5–600 kDa	Фракцияланыдн төмен диапазоын (G-10, G-20 тұзсыздануға қолайлы	Кеңейген формалары төмен қысымды қажет етеді/гидростатика.
Агароза	Sepharose 6B 10–4,000 kDa Sepharose 4B 60–20,000 kDa Sepharose CL-4B 60–20,000 kDa Sepharose CL-2B 70–40,000 kDa	Үлкен молекулаларға қолайлы. Химиялық "тігілген" сорбент формасы берігірек.	Колонка кеуіп кетпес үшін, ылғал болып тұру керек.
Аллил-декстран- бис акриламид	Sephacryl S-200 HR 5–250 kDa Sephacryl S-300 HR 10–1,500 kDa Sephacryl S-400 HR 20–8,000 kDa	Сорбент материалы биодegradацияға ұшырамайды/механ. беріктілік.	Колонка кеуіп кетпес үшін ылғал болып тұру керек.

Үлгілерді дайындау

Үлгілерді дұрыс дайындау сенімді шешімді қамтамасыз етеді және колоннаның жұмыс істеу мерзімін арттырады. Буфердің құрамы бөлудің тиімділігіне әсер етпейді. Үлгілер қатты бөлшектерден, әсіресе 34 мкм немесе одан кем диаметрі бар моншақтармен жұмыс істегенде, бос болуы керек.

Бағанды дайындау

Техниканы оңтайландыру, сондай-ақ тазалау жылдамдығын және тиімділігін арттыру үшін кішігірім құрама бағандарды пайдаланыңыз.

Бағанды өзіңіз толтыруды шешсеңіз, келесі ережелерді орындаңыз:

Баған мөлшері = әдетте гельдік қабат 5-15 см.

Гель саны = үлгіні байлау үшін қажетті гелдің мөлшерін есептеп, бағаны толтыру үшін бес есе көп пайдаланыңыз.

Толық ақпарат алу үшін әрбір нақты сорбент үшін жеке нұсқауларды қараңыз.

Буферді дайындау

Ақуыздың тұрақтылығы мен белсенділігімен үйлесімді рН-ны таңдаңыз. Буфердің концентрациясы үлгіні қолдану кезінде және тұз концентрациясының өзгеруі кезінде рН сақтау үшін жеткілікті болуы керек.

Сізге белгілі емес сипаттамалары бар үлгілермен жұмыс жасағанда, келесі шарттарды орындаңыз:

Градиент 0-100%: 10-20 т көлемі буферлік В;

Бастапқы буфер А:50 мН натрий фосфаты, рН 7,0 + 1-1,5 М аммоний сульфаты;

Элюирдену буфері В:50 мН натрий фосфаты, рН 7,0.

Бағандарды тазалау және сақтау

Ұсынылған сақтау шарттары баған нұсқауларында сипатталған. Әдетте бұл 4°C температурада

2.3 Аффиндік хроматография

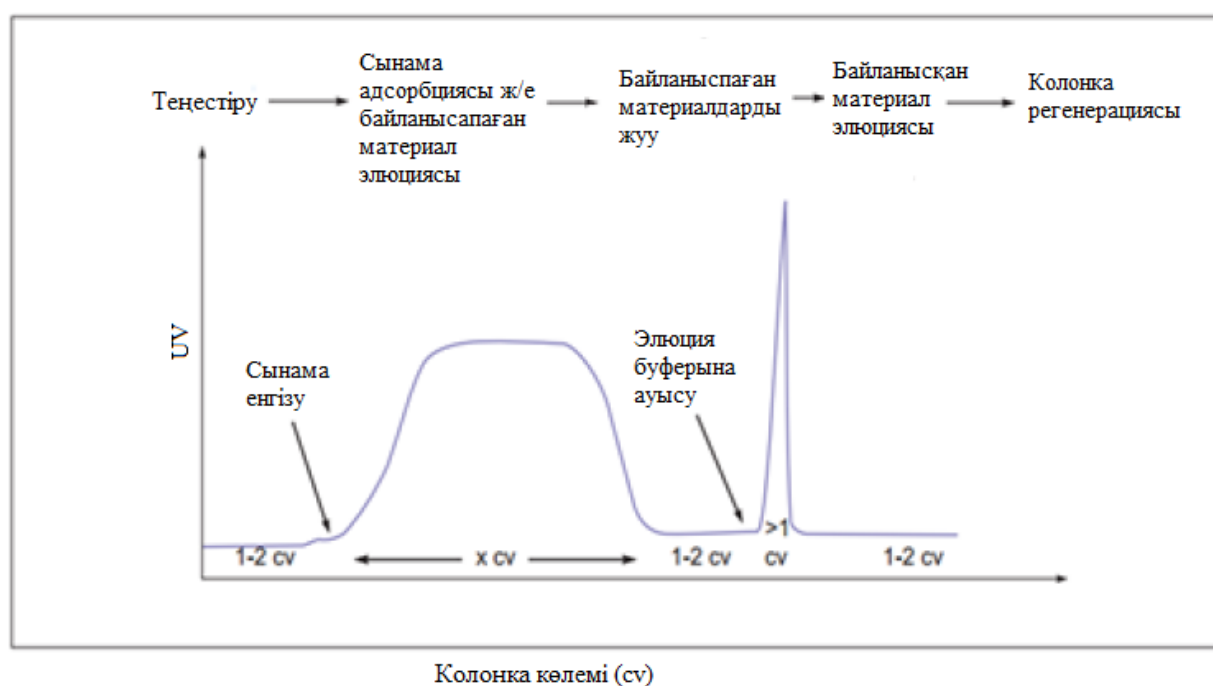
Аффиндік хроматография (АХ) биологиялық молекулаларды бөлу әдісі болып табылады. Бұл әдіс ақуыз және матрицамен байланысқан лиганд арасындағы өзіндік әсерлесуге негізделген. Техника жоғары селективтілікке ие және сәйкесінше жоғары ажыратымдылық береді, ал заттың өзі бірнеше мың есе тазалануы мүмкін. Аффиндік хроматография тазалаудың бірегей технологиясы болып табылады, себебі осы әдіс арқылы ғана биомолекулаларды олардың биологиялық функциялары немесе химиялық құрылымы негізінде тазалауға мүмкіндік береді. АХ нәтижесінде, басқа әдістердің көмегімен қиындық туғызатын немесе мүлде мүмкін емес ақуыздарды тазалау жүзеге асады. Лиганд пен нысана-молекула арасындағы биологиялық әсерлесу сутектік байланыс, электростатикалық, Ван-дер-Ваальстік немесе гидрофобтық әрекеттесулердің түзілуінің нәтижесі болуы мүмкін. Элюция не бәсекелі лиганд пайдаланумен, не рН, иондық күш немесе полярлықты өзгерту жолымен жүзеге асады. Аффиндік тазалаудың бір қадамы селективтілігі одан төменірек көпсатылы процедуралармен салыстырғанда орасан зор уақыт үнемдейді.

Сәтті аффиндік тазалау хроматографиялық матрицамен ковалентті байланысқа түсе алатын биоөзіндік лигандты талап етеді. Лигандқа екі талап қойылады: біріншіден, ол байланыспаған материал шайылғаннан кейін өзінің ұқсастығын сақтап қалуы керек, екіншіден, мақсатты затты белсенді формада жою мүмкін болуы үшін лиганд пен нысана-молекула арасындағы байланыс қайтымды болуы керек. АХ-да жиі қолданылатын бірнеше типтік биологиялық әрекеттесулер төменде көрсетілген:

- Фермент – субстрат, ингибитор, кофактор;
- Антидене – антиген, вирус, жасуша;
- Лектин – полисахарид, гликопротеин, жасуша бетіндегі рецептор, жасуша;

- Нуклеин қышқылдары – комплементарлық реттіліктер, гистондар, ДНҚ немесе РНҚ полимеразалар, нуклеин қышқылдарын байланыстыратын ақуыздар;
- Гормон, дәрумен – рецептор, ақуыз-таратушы;
- Глутатион – глутатион-S-трансфераза немесе онымен байланысқан протеин;
- Металл иондары – полигистидин тегті ақуыздар, бетінде цистенді және/немесе триптофанды қалдықтары бар ақуыздар.

Сондай-ақ аффинді тазалау белгілі бір ластаушыларды жою үшін қолданылуы мүмкін, мысалы, Benzamidine Sepharose сериндік протеазаларды (тромбин, X ұю факторы және т.б.) жояды. Аффиндік бөлудің негізгі сатылары 12-суретте көрсетілген.



12 сурет- Ақуыздарды аффиндік бөлудің сатылары

Аффиндік хроматографиямен бөлінетін кейбір ақуыздар

Иммуноглобулиндер

Антиген – антидене әрекеттесулерінің әртүрлілігі антиденелер және олардың фрагменттері үшін көптеген қосымшалар құрды. Олар терапия, диагностика және ғылыми зерттеулерде пайдаланылады. Рекомбинантты ДНҚ технологиясын пайдалану көптеген мәселелерді шешу үшін олардың қасиеттерін басқаруға мүмкіндік береді. Антиденелер және олардың

фрагменттерін тазалау үшін антиденелердің молекула – нысаналарының қасиеттері туралы көп ақпараттың бары елеулі артықшылығы болып табылады.

IgG, IgG фрагменттері және ішкі кластары

IgG және оның фрагменттерін бөлу А ақуызына ұқсастығына негізделген. G ұқсас ақуызы IgG Fc-фрагментімен байланысады. А және G ақуыздары – бұл бактериялық протеинтер (тиісінше, *Staphylococcus aureus* және *Streptococcus*), олар сефарозалы матрицада көптеген рәсімдер үшін өте пайдалы және қарапайым сорбентті құрайды.

Белгісі бар рекомбинантты ақуыздар

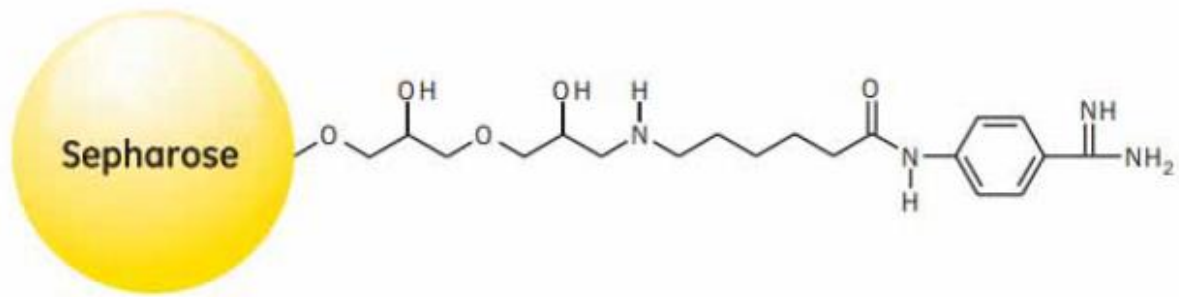
Рекомбинантты ақуызды тазалау қарапайым аффиндік тазалауға мүмкіндік беретін белгілі бір мөлшерлі тег енгізу есебінен жиі оңайлатылған болуы мүмкін. Глутатион-S-трансфераза (GST) және гексагистидиннің (His)₆ тегтері жиі пайдаланылады. А ақуызының таңбасы сондай-ақ IgG және ақуыз арасындағы аффинділікке қол жеткізу үшін пайдаланылады. Тегтер не плазмидаға не ПТР праймерлерге нысаналы фрагментті амплификациялауда енгізіледі.

Глутатион-S-трансфераза рекомбинантты ақуыздарды тазалауды жеңілдету үшін ең көп таралған, ең жиі қолданылатын тегтің бірі болып табылады. GST-таңбаланған ақуыздарды бірсатылы тазалау үшін өнім ассортименті мол. Сондай-ақ (His)₆ (His)₁₀ сияқты гистидиндік тегтер аффиндік тазалау үшін жиі қолданылады.

Гистидиндік тегтері бар ақуыздар сорбенттермен қатты байланысады және жоғары концентрациялы имидазолмен элюирленеді. Бұл мақсатты ақуызбен бірлесіп элюирленуі мүмкін ластануларды жоюды қамтамасыз етеді.

Сериндік протеаздарды тазалау немесе жою

Көптеген тазалау рәсімдері кезінде жасушаішілік протеаздар ерітіндіге түседі және қажетсіз протеолизаны болдырмау үшін протеаз ингибиторлары қосылады. Үлгіден протеазаларды бөлу немесе жою үшін ингибиторларды қосудың орнына аффиндік сорбенттерді қолдануға болады. Пара-аминобензамидин синтетикалық ингибиторы трипсин, трипсинтәріздес сериндік протеазалар және зимогендер үшін аффиндік лиганд ретінде пайдаланылады (13-сурет).



13 сурет- Бензамидин сефарозаның жартылай құрылымы
(<http://www.gelifesciences.com>)

Бензамидин сефароза жасушалық супернатанттан, бактериялық лизаттардан және сарысулардан протеазаларды жою үшін қолданылады. Тегі бар рекомбинантты ақуыздарды алу кезінде, мысалы GST, кейін өзіндік протеаза үшін, мысалы тромбин, сайт қосылады, бұл қажет болған жағдайда тегтен құтылуға мүмкіндік береді. Тромбинді қоспалардан тазалауды бензамидин сефарозада өткізуге болады.

ДНҚ-байланыстыратын ақуыздар

ДНҚ-байланыстыратын ақуыздар олардың ДНҚ-ны байланыстыру қабілеті бойынша біріктірілген ақуыздардың әртүрлі класын құрайды. Олар ДНҚ репликациясы мен бағдарына жауапты гистондар, рестриктазалар, транскрипционды активаторлар, ДНҚ- мен РНҚ-полимеразалар сияқты ақуыздарды қамтиды. Олар мақсатты ақуызбен бірігуі мүмкін. Лиганд ретінде гепарин жиі пайдаланылады. Гепарин қатты сульфатталған гликозамин болып табылады да, биомолекулалардың кең диапазонын байланыстыруға қабілетті, оның ішінде:

- Инициация факторы, элонгация факторы, рестриктаза, ДНҚ-лигаза, ДНҚ- және РНҚ-полимеразалар сияқты ДНҚ-байланыстыратын ақуыздар;
- Антитромбин III сияқты сериндік протеазалардың ингибиторлары;
- Протеолитикалық нексиндер;
- Фибробласттардың, Шванн, эндотелиалды сияқты өсу факторлары;
- Фибронектин, витронектин, ламинин, тромбоспондин, коллаген сәкілді жасуша сыртындағы матрикс ақуыздары;
- Эстроген және андроген секілді гормондардың рецепторлары;
- Липопротеиндер.

Гепариннің ақуызбен әретестесуінің екі режимі бар және екі жағдайда да әрекеттесу иондық күштің өсуімен әлсіреуі мүмкін:

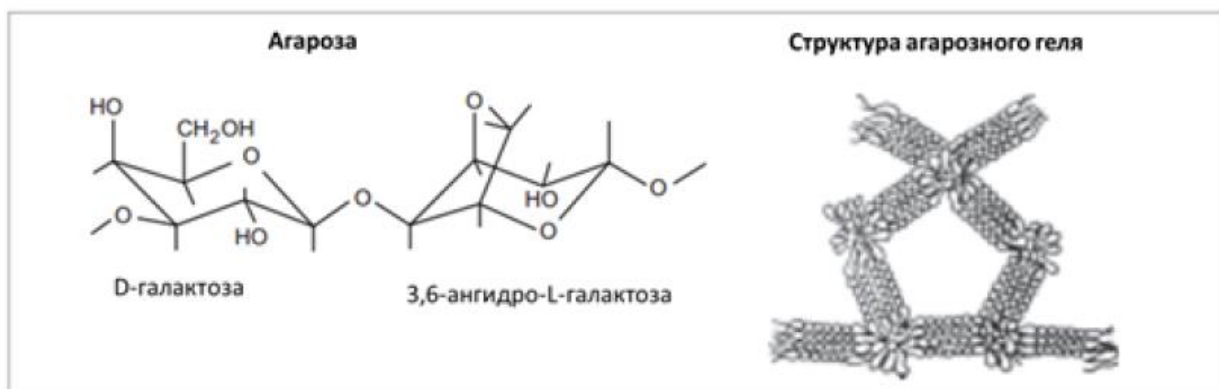
1. Бірінші жағдайда ДНҚ-байланыстыратын ақуыздармен әрекеттесу нуклеин қышқылдарының полианионды құрылымын қайталайды.
2. Екінші жағдайда антитромбин III коагулянттармен әрекеттеседі, гепарин аффиндік лиганд рөлін атқарады.

Сорбентті таңдау

Матрица лигандпен ковалентті немесе ковалентті емес байланысатын инертті тасымалдағыш болып табылады. Төменде хроматографиялық матрицалардың негізгі қасиеттері көрсетілген:

- Өте төмен тән емес адсорбция;
- Көмірсулы қалдықтардың гидроксилді топтары аффиндік лигандтарды ковалентті байланыстыру үшін өте қолайлы болып табылады;
- Тіпті үлкен биомолекулалар үшін жоғары байланыстыратын қабілетті қамтамасыз ететін ашық кеуекті құрылым;
- Жоғары және төмен рН, детергенттер және т.б. сияқты тәжірибе шарттары диапазонындағы тұрақтылық.

Сефароза – дөңгелек формадағы агароза, жоғарыда көрсетілген қасиеттердің көпшілігін көрсетеді. Бөлудің шарттарына сәйкес сефарозаларды өзгертеді және модифицирлейді. Негізінен агарозаның барлық түрлері бөлшектерінің диаметрі мен ішіндегі тігістердің саны бойынша ажыратылады.



14 сурет- Агарозаның құрылымы

Аффиндік хроматография үшін лигандты таңдау екі факторға тәуелді: лиганд мақсатты ақуызға қатысты қайтымды ұқсастыққа ие болуы керек және құрамында байланыстыратын белсенділікті бұзбай матрицада иммобилизациялана алатындай химиялық топтар болуы тиіс.

Буферді дайындау

Тазалығы жоғары су мен реактивтерді қолданыңыздар. Буферді өлшемі 0,45 немесе 0,22 мкм сүзгі арқылы сүзіп алыңыз және дәлділікке айтарлықтай әсер ететін көпіршіктердің болмауын қадағалаңыз. Байланыстыру, элюция және бағананың регенерациясына арналған буферлер әр сорбент үшін өзіндік болып табылады және лигандтың түріне қарай таңдалады.

Үлгілерді дайындау

Үлгілерді дұрыс дайындау жақсы дәлділікті қамтамасыз етеді және бағананың жұмыс істеу уақытын ұзартады. Аффиндік байланысуға кедергі жасайтын компоненттер үлгіден алынып тасталуы керек. Ақуыз бен лиганд арасындағы байланысу шарттары сақталған жағдайда үлгінің көлемі бөлуге әсер етпейді.

Бағананы дайындау

Үлгіні салу алдында байланыстыру үшін бағана буферде теңдестірілген болуы керек. Егер ақуыз бен лиганд арасындағы ұқсастық күшті болса, ағынның жоғары жылдамдығы қолданылуы мүмкін. Ал егер ұқсастық әлсіз болса, онда жылдамдығын азайту керек. Тиімді байланысқа қол жеткізу үшін ағынның оңтайлы жылдамдығы нақты әрекеттесуге байланысты ауытқып тұруы мүмкін және қажет болған жағдайда анықталуы тиіс.

Бағананы тазалау және сақтау

Ұсынылатын сақтау шарттары бағананың нұсқаулығында сипатталады.

Bio-Rad BioLogic LP хроматографиялық жүйесінде ақуыздар қоспасын бөлу

Тәжірибелік жұмыста Bio-Rad BioLogic LP хроматографиялық жүйесі қолданылады. Бұл қарапайым және сенімді хроматографиялық жүйе перистальтикалық сорғымен, градиент құру үшін миксермен және ерітінді өткізгіштігі мен УК-диапазонындағы сіңіру детекторларымен жабдықталған.

Студенттерге құрамында ат миоглобині, кональбумині, тауық овальбумині және трипсиннің соя ингибиторы бар ақуыздар қоспасын көлемі 1 мл Econo-Pac High Q немесе көлемі 1 мл Macro-Prep High Q ионалмасу картриджі көмегімен бөлу ұсынылады. (Қажет болған жағдайда құрамында қандай да бір басқа 4-5 ақуыз бар тесттік қоспаны бөлуге болады.) Ақуыз фракцияларын хроматографиялық бөлгеннен кейін студенттер электрофоретикалық талдау жасауы мүмкін.



15 сурет- Bio-Rad BioLogic LP хроматографиялық жүйесі

Қондырғылар мен реактивтер

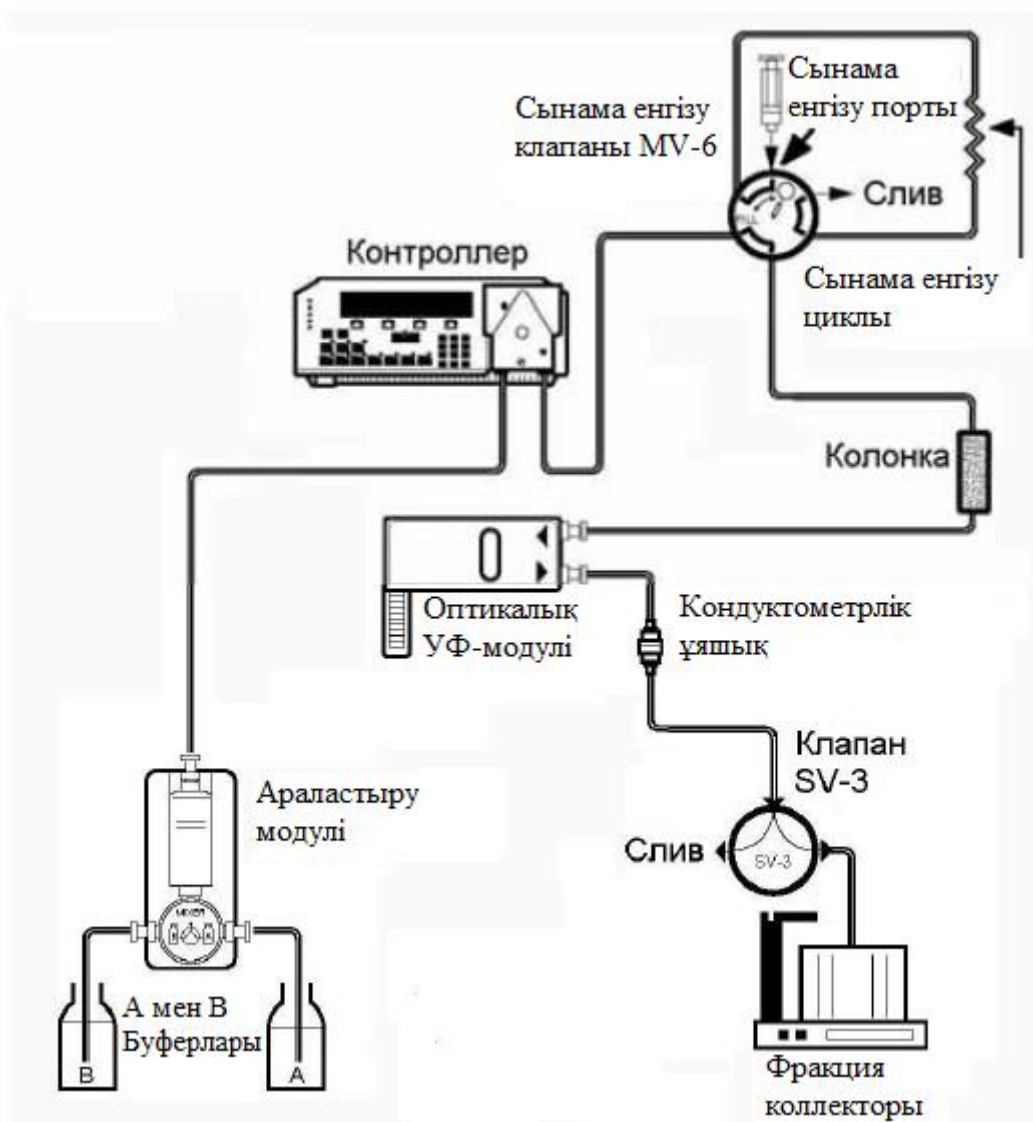
Қондырғы: Bio-Rad BioLogic LP хроматографиялық жүйесі.

Тәжірибелік жұмыс барысында Bio-Rad BioLogic LP хроматографиялық жүйесі қолданылады. Жүйе қолдану жөніндегі нұсқаулығына сәйкес орнатылуы және дайындалуы керек. Жүйе BioLogic LP DataView бағдарламасының көмегімен нәтижелерін тіркеу үшін компьютерге қосылуы керек. Бағдарлама алдын ала осы компьютерде орнатылуы тиіс. Жүйені компьютерге қосу үшін компьютердің COM-порты және хроматографиялық жүйемен жеткізілетін тиісті кабель пайдаланылады. BioLogic LP DataView бағдарламасы хроматограммаларды тіркеу және хроматографиялық жүйені басқаруға арналғандығына назар аударыңыз. Bio-Rad BioLogic LP хроматографиялық жүйесін барлық басқару оның контроллері арқылы жүзеге асырылады.

Жүйені орнату барысында онда пайдаланылатын фракциялар коллекторы көрсетілуі тиіс. Фракциялар коллекторымен жұмыс пайдаланылатын фракциялар коллекторының қолдану жөніндегі нұсқаулығына сәйкес жүзеге асырылады (осы жұмыс үшін Bio-Rad BioFrac немесе Bio-Rad Model 2110 Fraction Collector фракциялар коллекторымен жабдықталған Bio-Rad BioLogic LP жүйесін пайдалану ұсынылады).

Bio-Rad BioLogic LP жүйесіндегі үлгіні енгізуге арналған ілмектің орнату кезіндегі көлемі 2 мл болуы тиіс. Bio-Rad BioLogic LP жүйесі

перистальтикалық сорғымен жабдықталған және төмен қысымды жүйе болып табылады. Осы жұмыс үшін Bio-Rad компаниясының көлемі 1 мл Bio-Rad BioLogic LP Econo-Pac High Q немесе көлемі 1 мл Macro-Prep High Q хроматографиялық картридждері немесе күшті анионалмасу тасымалдағыштары бар ұқсас хроматографиялық картридждер/бағаналар пайдаланылады. 16-суретте Bio-Rad BioLogic LP хроматографиялық жүйесінің сызбасы және оның компоненттері көрсетілген.



16 сурет- Bio-Rad BioLogic LP хроматографиялық жүйесінің сызбасы

Буферлерді дайындау

Келесі буферлерді дайындаңыздар:

1. А буфері (иондық күші төмен буфер) – 500 мл;
2. В буфері (иондық күші жоғары буфер) – 25 мМ Трис-НСl, рН 8,1; 0,5 М NaCl – 500 мл.

Буферлерді дайындағаннан кейін мүмкіндігінше оны кеуектерінің өлшемі 0,45 мкм болатын еріткіштерді сүзу жүйесінің көмегімен сүзген жөн. Тоңазытқышта сақтау керек. Пайдалану алдында тәжірибе жүзеге асатын бөлме температурасына дейін қыздыру керек (егер хроматографиялық жүйе суық бөлмеде болса, бөлме температурасына дейін), ол жүйеде ауаның көпіршіктерінің пайда болмауы үшін қажет.

Назар аударыңыз: дәстүрлі хроматографияда әдіс басталатын буфер (ақуызды бағанаға "отырғызу" жүргізілетін) А буфері ретінде белгіленеді. Хроматографиялық жүйенің арнайы араластырғыш модулінде қажетті пропорцияда А буферімен араластыру арқылы бағанадағы ақуыздарды элюирлейтін градиент жасау үшін пайдаланылатын буфер В буфері ретінде белгіленеді. Ионалмасу хроматографиясы кезінде А буфері төмен иондық күші (төмен тұзды) бар буфер, В буфері жоғары иондық күші (жоғары тұзды) бар буфер болып табылады.

Ақуыздар қоспасын дайындау

10 мг-нан ат миоглобині, кональбумині, тауық овальбумині және трипсиннің соя ингибиторын алыңыз да, оларды көлемі 15 мл (түрі "Фалькон") және қақпағы жабылатын бір конустық пластикалық пробиркаға салыңыз. 10 мл деиондалған су қосыңыз. Ақуыз толық ерігенге дейін араластырыңыз, бірақ шайқаңыз (көпіртуден сақтаныңыз). Ақуыздар қоспасын қолданар алдында тоңазытқышта 1-2 күн сақтауға болады, егер ұзақ сақтау қажет болса, аликвоттарға бөліп -20°C мұздатқышқа салу қажет. Тікелей пайдаланар алдында еріту керек.

Хроматографиялық жүйені дайындау

1. Жүйені А және В буферлерімен толтырыңыз (картридж/бағананы орнату алдында):

- Дайын А және В буферлері бар ыдыстарға А және В буферлерін енгізуге арналған жүйенің түтіктерін батырыңыз. Назар аударыңыз, ыдыстарда буферлердің жеткілікті мөлшері болуы керек және жүйенің түтіктеріне жұмыс барысында ауа кіруін болдырмау үшін олар буфері бар ыдыстардың түбіне дейін батуы қажет.

- В буферінің кіру арнасын толтырыңыз: Manual режимінің батырмасын басыңыз. Насос функциясын (Pump) таңдаңыз. В буферін таңдаңыз. Purge

(шаю) функциясын іске қосыңыз. 3 мин күтіңіз. Шаюды тоқтатыңыз (Stop функциясы).

- А буферінің кіру арнасын және барлық жүйені А буферімен толтырыңыз. Manual режимінің батырмасын басыңыз. Насос функциясын (Pump) таңдаңыз. А буферін таңдаңыз. Purge (шаю) функциясын іске қосыңыз. 5 мин күтіңіз. Шаюды тоқтатыңыз (Stop функциясы).

Назар аударыңыз, жүйені буферлермен толтыру кезінде алдымен В буферінің арнасы толтырылады, содан кейін А буферінің арнасы және барлық келесі жүйе А буферімен толтырылады. (В буферінің арнасы аралас модульге дейін В буферімен толтырылады.). Бұл экспериментті жүргізу кезінде дұрыс градиенті қалыптастыруға мүмкіндік береді.

2. Нұсқаулыққа сәйкес хроматографиялық жүйеге картридж/бағананы орнатыңыз.

Жұмыс реті:

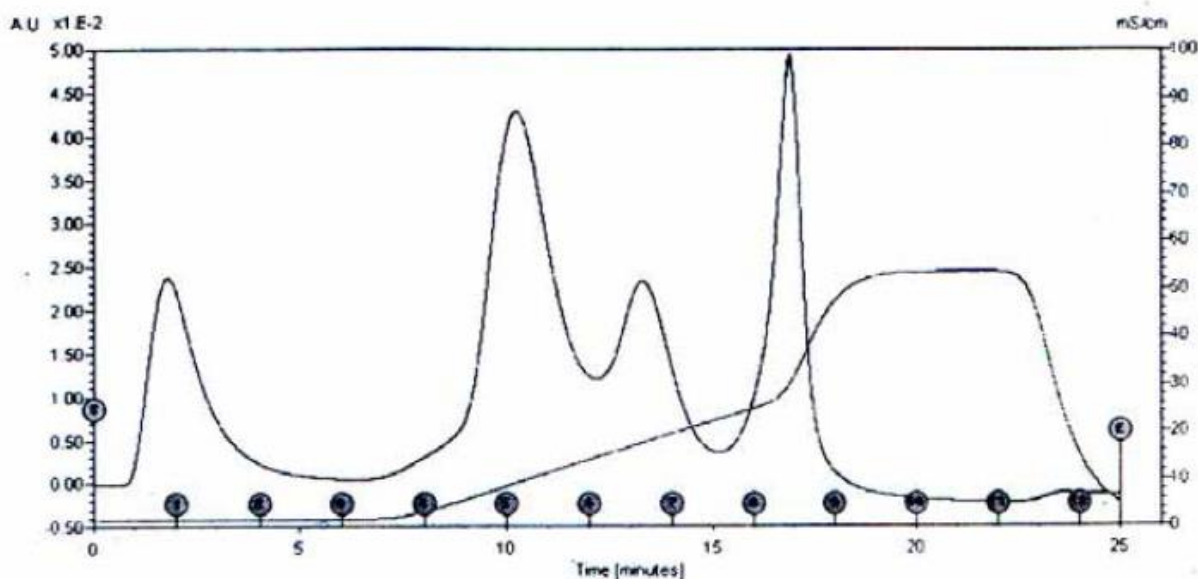
1. Әдісті бағдарламалаңыз.

Назар аударыңыз: Әдісті бағдарламалау Bio-Rad BioLogic LP жүйесінің контроллерінде жүзеге асады.

Әдісті бағдарламалау:

Program батырмасын басыңыз, **New Method** таңдаңыз.

1. Уақыт бойынша (Time) бағдарламалау функциясын таңдаңыз.
2. Насостың жұмыс бағдарламасын енгізіңіз:



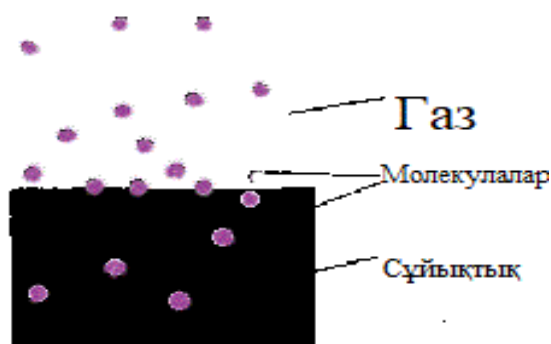
17 сурет- Ақуыздардың сынама қоспасының бөлінуінің типтік хроматограммасы.

2.4 Хромато-Масс-Спектрометрия

1952 жылы ағылшын ғалымы А.Дж.Мартин және оның қызметшісі А.Джеймс май қышқылдарына талдау жүргізгенде, екі маңызды бақылау жасады. Біріншіден, олар хроматография әдісімен еріген сұйық заттарды ғана емес, газды және буды бөлуге болатынын анықтады. Екіншіден, олар бөлу тек көп дүркін адсорбция-десорбция циклінің қайталануынан ғана емес, адсорбция және десорбция алмасу жолымен жүзеге асатынын көрсетті.

Адсорбция және десорбция бір-бірінен бір әріп бойынша ерекшеленеді, бірақ олар әртүрлі процестерді түсіндіру үшін қолданылады. Адсорбция фазаның бөлу бетіндегі заттың концентрленуі болып табылады (қатты-газ тәріздес, қатты-бу тәріздес, қатты-сұйық).

Адсорбция кезінде, ерітінділер, газдар немесе булар сұйық фазамен жанасады, бірақ осы заттардың молекулалары бөлу бетінде бөгелмей, сіңіп кетеді, яғни сұйық және қатты заттардың көлемінде ериді (18-сурет). Сұйықтықтағы газдарды адсорбциялауға байланысты құбылыс ең кең таралған бөлу әдісі- газ-сұйық хроматографиясының негізінде жатыр. Сұйық ерітіндінің жоғары бөлігінде газ болған кезде, газ фазасында қалатын және сұйықтықта ерітілген газ молекулалары арасында динамикалық тепе-теңдік орнайды. Егер сұйықтықтың жоғары жағында жеке газ емес, газ қоспасы болса, қоспа қозғала бастайды, яғни осы сұйықтықтағы әр түрлі ерігіштігі бар газ қоспасының жекелеген компоненттері түрлі жылдамдықпен қозғалады. Соңында, газ қоспасы құрамдас бөліктерге бөлінеді. Көрініп тұрғандай, Цветтің ұсынған сұйық қоспаларды бөлу принципі газ қоспаларын талдау үшін де пайдаланылуы мүмкін. Бұл принципті аналитикалық практикаға енгізу хроматографиялық жаңа ғасырын ашты.



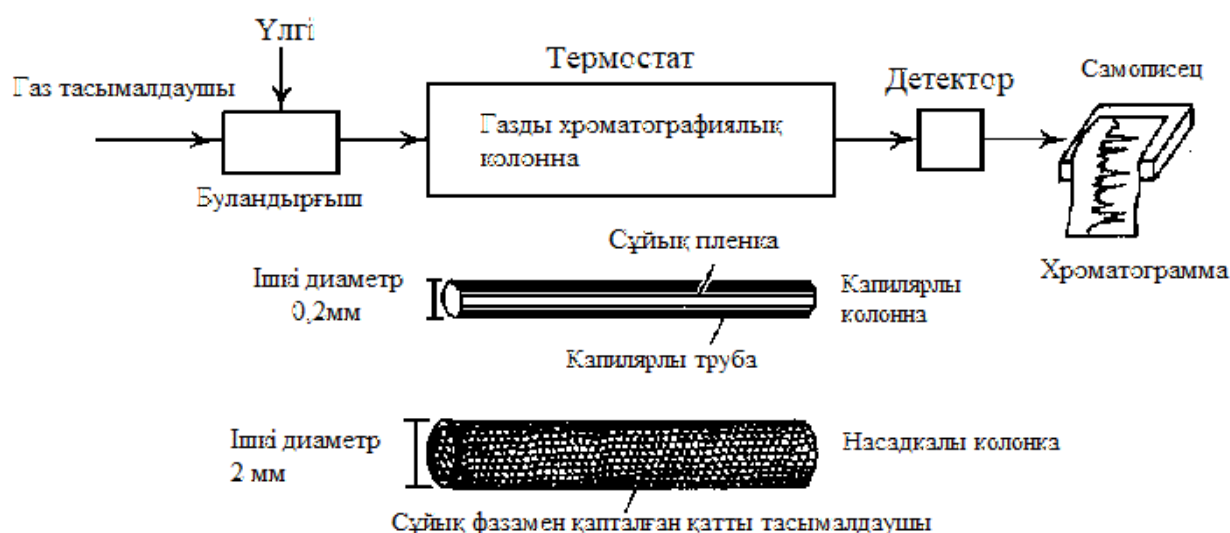
18 сурет - Сұйық және газды фазаның бөліну шекарасында адсорбция

Көптеген хроматографиялық әдістер талданған қоспаны жылжымалы фазамен бірге хроматографиялық баған арқылы өткізуге негізделген. Қозғалмайтын фаза тұрақты тасымалдағыш немесе сұйықтық болуына байланысты талданған қоспаның компоненттері қатты дененің бетінде адсорбцияланады немесе сұйықтықтықта ериді. Нәтижесінде бұл компоненттер қозғалмайтын фазада ұсталынады және инертті қозғалмалы фазаға қарағанда,

бағана бойынша баяу жылжиды. Егер хроматографиялық жағдай бөліну үшін қолайлы болса, сонда әр компонент қозғалмайтын фазада әртүрлі ұсталынады. Нәтижесінде, жеке компоненттердің бағана бойымен жылжу жылдамдығы Цветтің тәжірибесіндей әртүрлі, яғни әр компонент сақина түзеді, бұл сақиналар бөлек бірінен соң бірі бағанадан шығады. Бағанадағы қоспаның бөліну механизмі бөлек компоненттер газды немесе сұйық фазада болуына байланысты, алайда хроматографтар, газды және бу түріндегі қоспаны талдауға арналған құрылғы газды хроматограф, ал талдау әдісі-газды хроматография деп аталады. Сұйық қоспаларды сұйық хроматограф көмегімен талдайды, және талдау әдісі сұйық хроматография деп аталады.

Хроматографияға арналған құрал-жабдықтар

Барлық хроматографтар төрт негізгі бөліктен тұрады: сынаманы енгізуге арналған құрылғы, хроматографиялық бағана, детектор, регистратор. Газды хроматографтың принципіальды сызбасы 19- суретте көрсетілген.

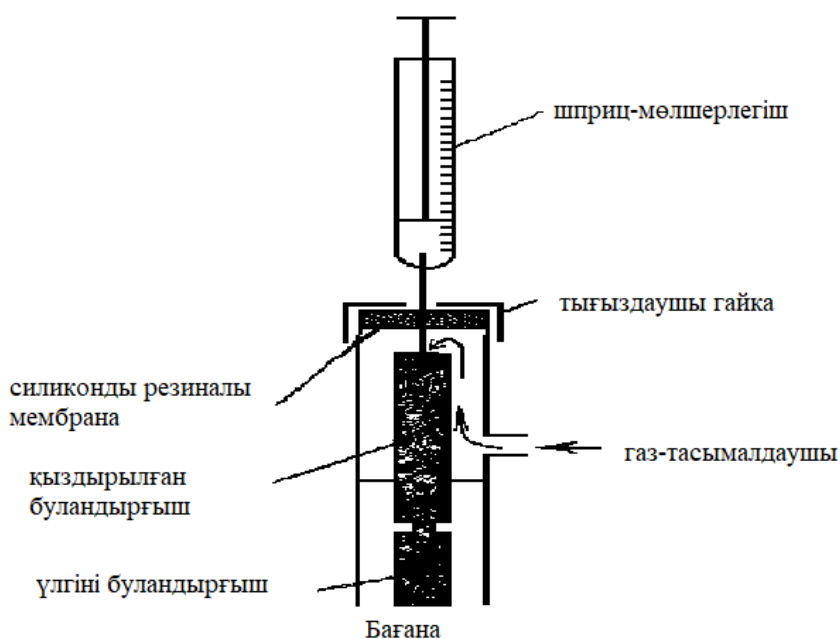


19 сурет - Газ хроматографиясының схемасы.

Қоспалар бөлінетін баған хроматографияның жаны деп есептеледі, бірақ қазіргі заманғы құрылғыларда бұл құрылғы алғашқы эксперименттерде қолданылатын кең түтікке ұқсас емес. Әдетте, хроматографиялық бағандар металл немесе шыныдан жасалған, ал қазір ішкі диаметрі 2 мм-ден аспайтын, ұзындығы бірнеше сантиметрден бірнеше метрге дейін өзгертін кварц құбырларынан дайындалады. Ұзын құбырларды температуралық басқарылатын хроматография камерасына орналастыру үшін, яғни термостатта, оларды әдетте спиральға бұрайды. Мұндай бағанда қозғалмайтын фаза болады. Тұрақты қозғалмайтын фаза кеуекті адсорбент болып табылады. Сұйық қозғалмайтын фазасы бар колонкалар екі жолмен дайындалуы мүмкін. Бірінші

әдіс бағанаға алдын-ала сұйық фазамен сіңірілген қатты адсорбенттерді орналастырудан тұрады. Екінші әдіс - сұйық фазаны ұзын капиллярлардың кеуекті қабырғаларына қондырады.

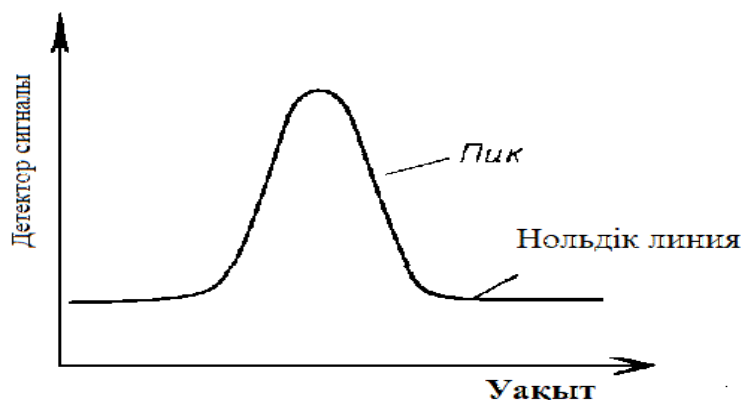
Хроматографияның маңызды бөлшегі - сынаманы енгізуге арналған дозатор-құрылғысы болып, бұл ықшам бөлік ретінде тасымалдаушы газ ағынына қатаң анализденетін заттың айтарлықтай мөлшерін енгізуге мүмкіндік береді. Үлгіні жиі келесі түрде енгізеді. Бірінші, үлгі шприц-дозаторға медициналық шприцтің инесі арқылы түсіріледі, содан кейін 20-суретте көрсетілгендей, бұл инемен силиконды тығыздағышты тесіп, тасымалдағыш газ ағынына сәйкес үлгі көлемін енгізеді. Үлгіні енгізудің кеңінен қолданылатын тағы бір тәсілі келесідей. Бастапқыда алдын-ала дәл анықталған көлем, сынақ газының ағыны шағын түтік арқылы өтеді. Содан кейін, кранды айналдыру арқылы осы белгілі көлем тасымалдаушы газға келіп түседі және сол жерден қалған үлгіні бағанаға итереді. Газ хроматографияның дозаторы жылыту құрылғысымен жабдықталған, бұл сұйықтың үлгілерін бөлме температурасында қамтамасыз етуге мүмкіндік береді. Жылытылған дозатор сұйық үлгіні өте жылдам буландырады, ал нәтижесінде пайда болған бу тасымалдайтын газ ағынына енеді және газбен бірге хроматографияның бөлу бағанына енеді.



20 сурет - Үлгіні шприц-диспенсермен өзіндік тығыздағыш резеңке арқылы енгізу

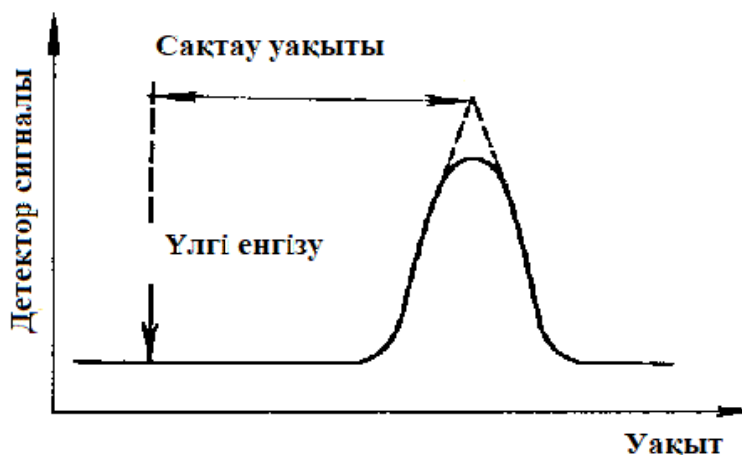
Бөлу әдісін қадағалау үшін, бағана арқылы өтетін қоспа компоненттерінің өту уақытын дәл өлшеу керек, яғни бағанадан шығу уақыты. Бұл мақсатқа жету үшін, бағанадан шығатын компоненттерінің қандай да бір физикалық

қасиеттерінің өзгеруі кезінде электрикалық сигнал беретін қасиетке ие, детектор-құрылғылар атқарады. Егер детектор арқылы газ тасымалдағыш өтсе, диаграммалы сызықта бір немесе одан аз нөлдік сызық деп аталатын, горизонтальды түзу жазылады. Егер тасымалдаушы газдың ағынымен анықталатын компонент детекторға түссе, перо самописца тасымалдағыш газға сызықтан ауытқи бастайды және диаграмма лентасы қозғалыс бағытына перпендикуляр бағытта қозғалады. Қоспаның компоненттері детекторда бөлінгеннен кейін, хроматограмма - қоңырау тәрізді шындардың жиынтығы, әр шың бір компонентке сәйкес келеді. (21-сурет).



21 сурет - Уақыт бойынша хроматографиялық шыңның биіктігін өзгерту

Детектор қоспаның қандай да бір белгілі физикалық қасиеттерінің өзгеруін тіркей алады, мысалы, оның жылу өткізгіштік немесе сыну көрсеткіштері. Сондықтан, бағаннан шыққан қоспаның физикалық қасиеттері құрамға тәуелді болғандықтан, жеке аймақтың детектор арқылы өту уақыты тиісті сигналмен жазылады. Органикалық заттарды идентификациялау үшін ұстап алу уақыты пайдаланылады, яғни детекторда зат пайда болғанға дейін үлгі хроматографқа енгізілген сәттен бастап (22-сурет).



22 сурет -Хроматографиялық шыңы бойынша сақтау уақытын анықтау

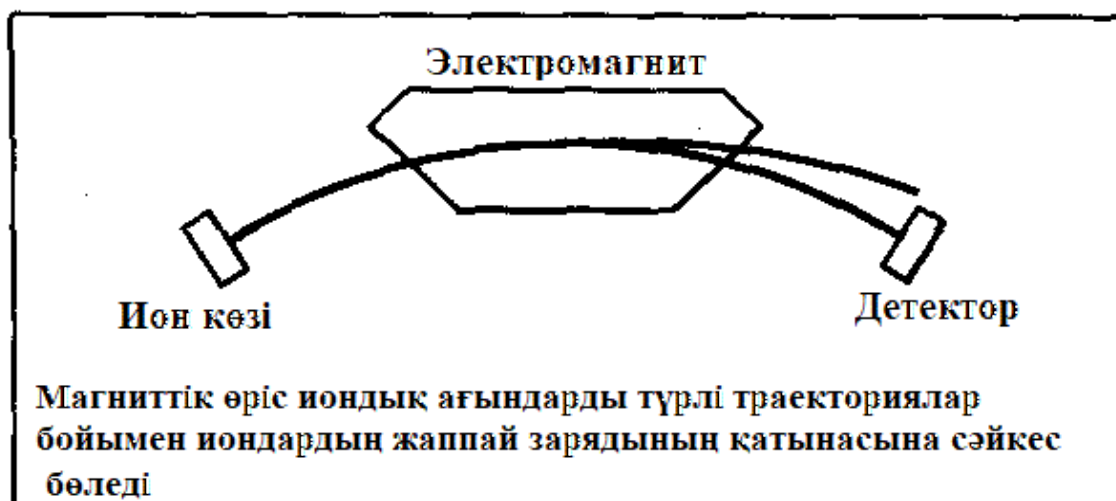
Идентификацияның сенімділік дұрыстылығын таза индивидуальды қосылыс көмегімен тексереді. Оны келесі жолмен жасайды. Зерттелетін қоспаны бірнеше үлгіге бөледі және әрбір үлгіге қатаң анықталған жеке қосылысты енгізеді. Егер сақтау уақытын сәйкестендіру дұрыс болса, жеке құрамды енгізгеннен кейін тиісті шыңның биіктігі хроматограммада өседі. Дегенмен, бұл әдіс бір мәнді деп аталмайды, себебі көптеген органикалық қосылыстардың арасында сақтау уақыттары бірдей көптеген заттар бар.

Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрияның басталуы 1908 жылы физиктердің жұмысымен басталды. 1918 жылға қарай бұл әдістің дамуы, массасы 20 және 22 болып табылатын неонның екі изотоптарының бар екенін көрсетті. Бұл ақпарат химиялық атом салмағының концепциясының қайта қаралуына алып келді, атом дәуірінің жаршысы болды. 1942 жылға қарай масс-спектрометрлер жоғары жылдамдықпен және дәлдікпен газ қоспаларын талдау үшін сериялық түрде шығарылды. Қазіргі таңда масс-спектрометрия ғылыми зерттеу жұмыстарының барлық аспектілерінде негізгі пәндерінің бірі болып табылады.

Масс-спектрометрияның теориясы

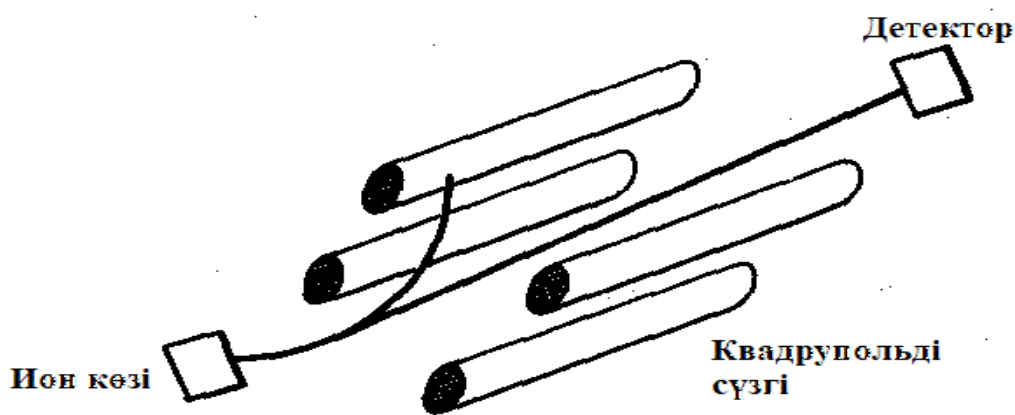
Масс-спектрометрия екі жеке үрдістің жиынтығы ретінде қарастырылуы мүмкін: ионизация және масса бойынша иондардың бөлінуі және түзілген иондарды тіркеу. Ионизацияның сансыз әдістерін иондардың бөлінуінің әртүрлі әдістерімен қойылған міндетке байланысты үйлестіруге болады. 23-суретте магнитті масс-спектрометрдің жұмыс істеу принципі көрсетілген



23 сурет -Масс-спектрометрдің схемалық диаграммасы

Газ тәрізді молекулалардың электрондарымен бомбаланған кезде молекулалардағы байланыс бұзылады да, иондар түзіледі. Түзілген фрагменттердің түрі мен саны берілген молекулаға тән. Магнит өрісі қолданылған кезде оң зарядталған бөлшектер қисық қиғаш бойымен тездетіледі және қозғалады, ион массасының квадрат түбіріне қисық радиусы пропорционал. Кейбір тұрақты магнит өрісі үшін бірдей массасы / заряд деңгейі бар ион ағыны коллекторға түседі. Мұнда, иондар зарядталғаннан кейін, тиісті массасы бар салыстырмалы ион санына пропорционал ток пайда болады. Магниттің өрістің өзгеруі біртіндеп коллекторға басқа қатынастағы масса / заряд ион ағынын аударады. Коллектор тоғы жазылады және масс-спектограммаға беріледі. Масс-спектр молекула идентификациясына қызмет етеді.

Квадрупольды масс-спектрометрінде (24-сурет) масса бойынша бөлу басқа тәсілмен жүзеге асырылады. Төрт тұрақты магнит арасында жоғары жиілікті электр өрісі қалыптасады.



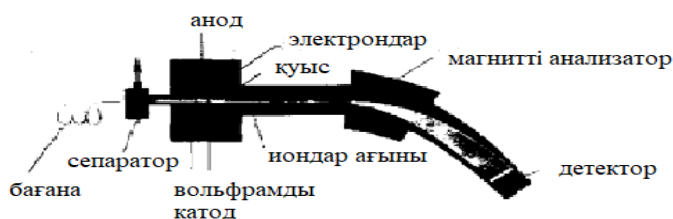
24 сурет - Квадрупольдің масс-спектрометрі схемасы

Ион сәулелері осы өріске енген кезде белгілі бір масса / заряд деңгейі бар иондар тұрақты траекторияға ие және детекторға (коллектор) түседі. Әр түрлі массасы / заряды коэффициенттері бар сәулелерді табу электр өрісін өзгерту арқылы жүзеге асырылады.

Үлкен молекула массасы бар бірнеше заттардан тұратын үлгінің масс-спектрін шешуге тырысқанда кездесетін қиындықтарды елестетуге болады. Сонымен қатар, газ хроматографиясын масс-спектрометрге қоссаңыз, онда спектрдің түсіндірілуі әлдеқайда оңай болады, өйткені бомбардировкадан бұрын қоспа жеке құрамдастарға бөлінеді.

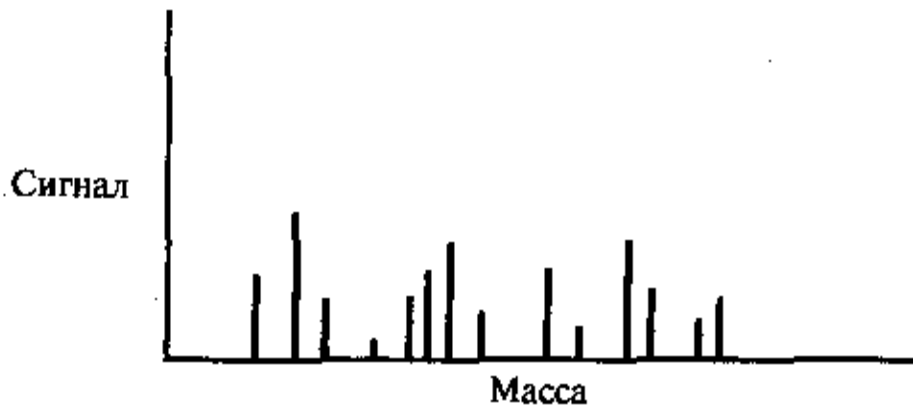
Хромато-масс-спектрометрия

Масс-спектрометр көптен газ хроматографиясының тамаша детекторы болып саналады. Газ хроматограф сияқты масс-спектрометр салыстырмалы түрде қарапайым құрылғылар болып табылады, олардың әрқайсысымен алынған аналитикалық деректер түсінуге және пайдалануға оңай. Бұл екі құрылғы бір хроматография-масс-спектрометриялық жүйеге тікелей қосылғанда, осындай жүйенің мүмкіндіктері әр құрылғының мүмкіндіктерінің сомасына тең емес, аналитикалық мүмкіндіктер экспоненциалды түрде өседі. Хроматографиялық-масс-спектрометрмен генерацияланған үлкен көлемді мәліметтерге толыққанды әсер ету үшін арнайы компьютер қажет. Компьютерді құрылғыға қосу арқылы өздерінің аналитикалық мәнін арттыратын көптеген деректер операциялары мүмкін болады. Масс-спектрометрлік детектор көмегімен алынған спектрлер басқа газ-хроматографиялық детекторлар бере алмайтын үлгілердің сапалық құрамы туралы ақпаратты береді. Масс-спектрометрлер детекторы жоғары сезімталдыққа ие, сонымен қатар ол үлгіні бұзады, массалар туралы ақпаратты береді және изомерлерден гомологтарды айырады. Газ хроматографымен бірге масс-спектрометрдің схемалық сызбасы 25-суретте көрсетілген.



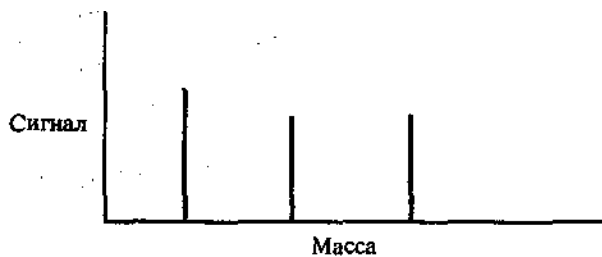
25 сурет - Газ хроматографымен бірге масс-спектрометрдің схемасы

Хромато-масс-спектрометриялық талдаудағы бірінші қадам әдетте бүкіл масс ауқымда сканерленеді (26-сурет) Сәйкестендіру спектрлердің кітапханасы арқылы жүзеге асырылады, ол жиі детектордың жұмысын бақылайтын компьютерлік (ЭВМ) жадқа кіреді. Құрылымды анықтауда шындар мен молекулалық иондарды зерттеу маңызды рөл атқарады.



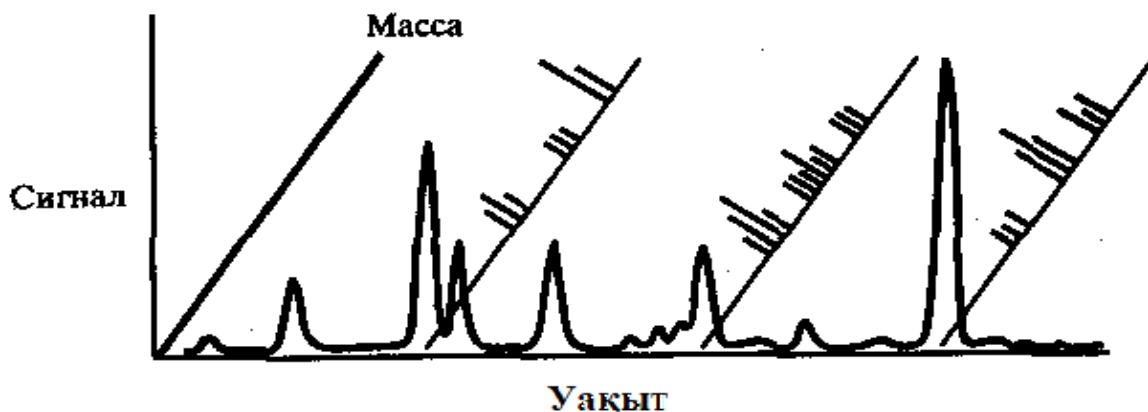
26 сурет - Спектр толық сканерге сәйкес келеді. Белгілі бір ауқымда массаның / зарядтың барлық коэффициенттері өлшенеді

27-суретте көрсетілген келесі қадам - жеке иондарды (SIM) тіркеуде қолданылатын сапалы талдау. Ол үшін иондардың бірнеше түрін зерттеуге арналған және сол арқылы сезімталдықты арттыратын сүзгілер қолданылады.



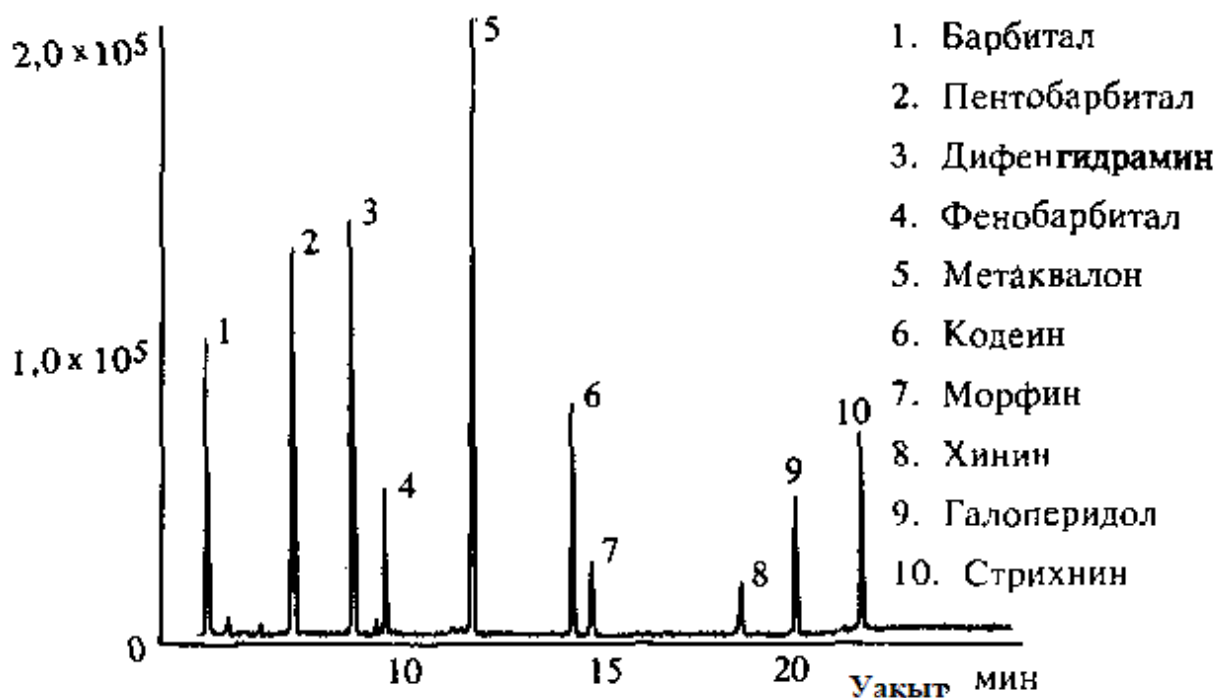
27 сурет - Таңдалған массасы / заряды коэффициенті бар жеке иондарға тіркеу жүргізілді. Өлшеу уақыты ұлғайып, сезімталдықты арттыруға мүмкіндік берді

Соңында, үлгіде (TIC) барлық ион бойынша хроматограмманы алу үшін, барлық осцилограммаларды жекелеген иондарға жинақтап, бір уақыт ауқымымен диаграммаға енгізеді (28-сурет)

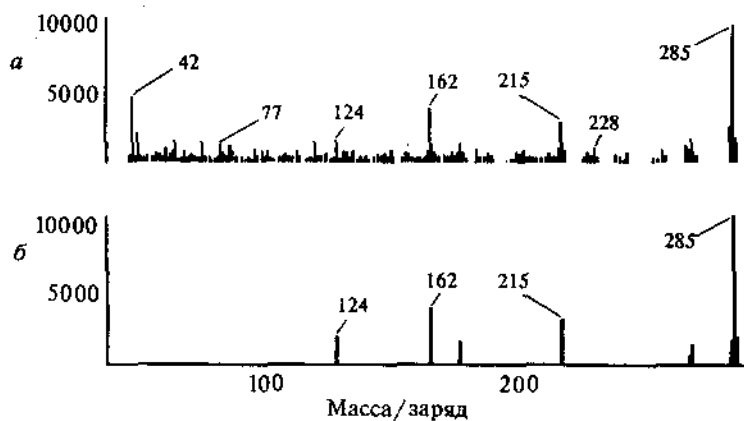


28 сурет - Барлық иондарға арналған хроматограмманың мысалы

ГХ-МС әдістерін одан әрі дамыту және компьютерлік технологияны кеңінен пайдалану масс-спектрометрия мамандарға ғана емес, газ хроматографиясында стандартты әдіс ретінде белсенді түрде қолданыла бастады. Компьютер жүйені толығымен басқарады, деректерді жазады, масс-спектрін жинайды. Секунд ішінде масс-спектрлердің жинақталуы көп көлемді жадты және машинаның жоғары жылдамдығын талап етеді. Дәрілік заттардың қоспасын бөлу үшін хромато-масс-спектрометрияны қолданылуы 29-суретте көрсетілген.



29 сурет - Заттың спектрін морфинді сақтау уақытымен салыстыру



30 сурет - деректер банкіне енгізілген морфиндік спектрімен салыстыру

Қазіргі уақытта масс-спектрометрлер компьютер жиынтығымен ғана шығарады. Идентификацияда үлкен көмек клиенттің құрылғымен қабылдайтын масс-спектральды деректер банкі арқылы жүзеге асырылады. Масс-спектрометриялық талдау жүргізілген сайын, компьютердің жадына жаңа деректер үнемі еніп, деректер банкін толтырады. Егер банк қызметін қолдану қажет болса, талдаушы компьютерге өтініш жібереді және компьютердің өзі қазіргі уақытта тіркелген спектрге сәйкес келетін спектрді жадыда табады. Екі спектр экранда пайда болады, енді екі спектральды үлгіні салыстыруға болады. Спектрлерді салыстыру, яғни, белгісіз заттарды саусақ іздерімен анықтау, өзіндік бөлшектері арқылы молекулаларды қалпына келтіруге қарағанда оңайырақ. Осындай сәйкестендірудің жалғыз шарты - анализге ұсынылған сол заттың спектрі деректерінің дерекқорында болуы.

Хромато-масс-спектрометрия химияның әртүрлі салаларында, медицина, фармацевтикалық өндіріс, қоршаған ортаның мониторингі және технологиялық бақылаудың әр түрлі салаларында кең қолданыс тапты.


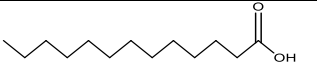
Өсімдік шикізатынан алынған экстракттердің немесе фракциялардың құрамынан липофилді фракцияны (эфир майларын) зерттеу барысында газды хроматография - масс-спектрометриясы әдісі кеңінен қолданылады.

Эфир майлары – бұл өсімдіктер құрамында болатын және оларға тиісті хош иіс беріп тұратын ұшқыш заттардың атауы. Эфир майлары органикалық қосылыстардың әр түрлі кластарына жатқызуға болатын ұшқыш заттар қоспаларын түзеді. Өсімдіктерде бұл заттар ерекше орыншаларда орналасқан – эфир тасымалдаушы арналарда кейде шайырлармен қатарлас; көбінесе темірлі талшықты құрамды болып келеді, бұдан басқа эфир майлары жасуша шырынды эмульсия түрінде кездеседі, ал соңғы уақытта паренхима жасушасында шайыр мен эфир майлары қатысатын дәлелденген деп санауға болады.

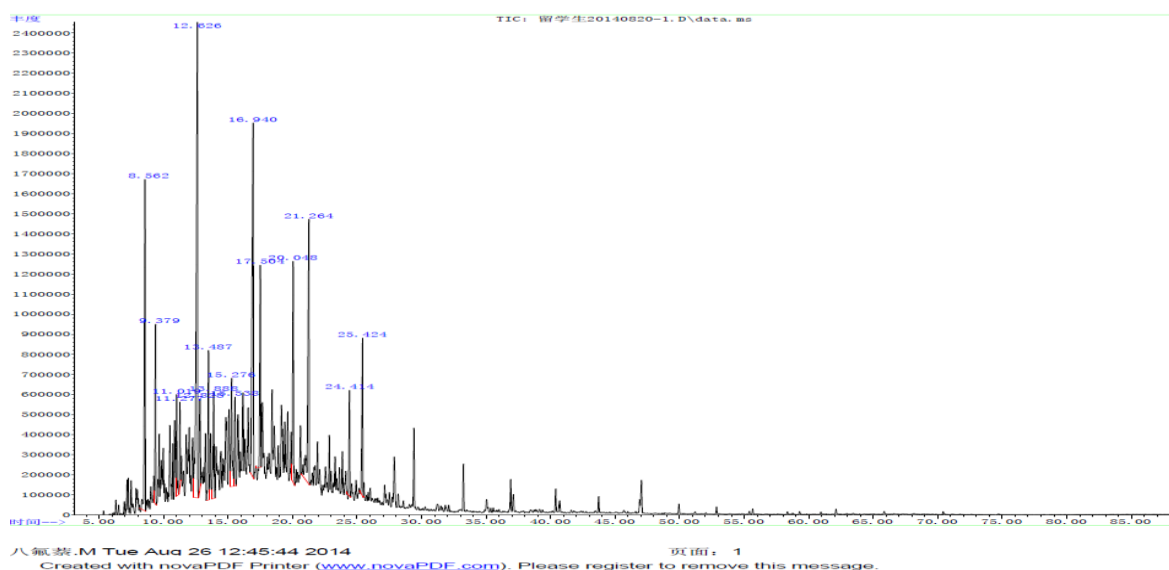
«Эфир майлары патогенді штамдарының кең ауқымды бактерияға қарсы агент ретінде әрекет ете алады» - деген дәлелдер бар. Кейбір эфир майлары табиғи жағдайында пайдаланылған кезде гипотензияға белсенділігі бар және олар гипертензия емдеу үшін пайдаланылады. Органикалық қосылыстардың эфир майларының көп компоненттері хош иісті өсімдіктер құрам бөліктерінде табылған. Олар өте күрделі химиялық қасиеті және әр түрлі жағдайларда тиімділігі бар.

5 – ші кестелерде *Climacoptera* текті өсімдіктің ГХ/МС сараптау бойынша эфир майларының химиялық құрамы көрсетілген.

5 кесте - *Climacoptera* текті өсімдігінің липофилді құрамы

t _R мин	Липофилді заттардың аты	Молекула- лық формула	Құра- мы %	Мол. масс	Құрылысы
14.5	n-Гексадекан қышқылы	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1.04	256.4	
14.9	Тридекан қышқылы	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	0.38	214.1	

15.7	Этил эфирінің гексадекан қышқылы	$C_{18}H_{36}O_2$	0.42	284.2	
15.9	Этил эфирінің додекан қышқылы	$C_{14}H_{28}O_2$	2.32	228.2	
16.3	Октадекан	$C_{18}H_{38}$	4.02	254.7	
16.7	Олеин қышқылы	$C_{18}H_{34}O_2$	3.02	282.4	
17.0	Z-7- пентадеканол	$C_{15}H_{30}O$	0.56	226.4	
17.1	Октадекан қышқылы	$C_{18}H_{36}O_2$	0,53	284.2	
18.0	Этил эфирінің октадекан қышқылы	$C_{20}H_{40}O_2$	0.43	312.3	
18.1	Этил эфирінің тетрадекан қышқылы	$C_{16}H_{32}O_2$	0.47	256.4	
20.8	2-метил додекан	$C_{13}H_{28}$	0.45	184.36	



31 сурет - ГХ/МС әдісі арқылы *Climacoptera* өсімдігінің гександы экстракциясынан алынған липофильді заттар

Тақырыпты пысықтауға арналған сұрақтар:

1. Иондық алмасу хроматографиясын қалай түсінесіз?
2. Иондық алмасу хроматографиясы кезінде ақуыздардың жалпы заряды бойынша бөліну жолдарын түсіндірініз?

3. Ион алмастырғыш сорбенттерде қолданылатын функционалдық топтарды атаңыз?
4. Q Sepharosa және SP Sepharosa титрлеу қисықтарын түсіндіріңіз?
5. Күшті ион алмастырғыштың жұмыс істеу артықшылығын т.сіндіріңіз?
6. Гидрофобты хроматография дегеніміз не?
7. Гидрофобты Хроматографиямен ақуыздарды қалай бөлеміз?
8. Гидрофобты хроматографияда қандай сорбенттер қолдану тиімді?
9. ГХ қолданылатын гидрофобты лигандтар?
10. ГХ үлгілерді дайындауда ескеретін жағдайлар?
11. Гель фильтрлеу немесе эксклюзивті хроматография дегеніміз?
12. Гель фильтрлеуде рН тың әсері?
13. Эксклюзивті хроматография үшін кең қолданатын сорбенттерді атаңыз?
14. Аффиндік хроматографияны түсіндіріңіз?
15. Аффиндік хроматографияда жиі қолданылатын типтік биологиялық әрекеттесулерді түсіндіріңіз?
16. АХ-мен қандай ақуыздар бөлінеді?
17. АХ –да тиімді сорбенттер қандай?
18. Bio-Rad BioLogic LP хроматографиялық жүйені түсіндіріңіз?
19. Хромато-Масс-Спектрометрия түсіндіріңіз?
20. ГХ-МС дәрілік заттарда маңыздылығы?

2.5 Жоғарыкритикалық флюидті экстракцияның жетістігі және қолданылуы

Бүгінгі күні әлемде жоғары критикалық флюидті технологиялардың практикалық қолданылуының 80-нен астам аймағы мәлім. Мұнда Германия, АҚШ, Үндістан, Қытай, және басқа да елдер жетістіктерге жетіп жатыр.

Жоғарыкритикалық ортада өсімдік шикізатын өңдеу Азия елдерінің өнеркәсіптеріне белсенді енгізілуде. Ең алдымен өсімдік шикізатының флористикалық құрамының ерекшелігіне байланысты. Екіншіден, бұл елдердің фитотерапия облысында көп ғасырлық дәстүрі бар және олардың тәжірибесі бүкіл әлем фитофармацевтикасының дамуына объективті әсер етеді. Бұл елдердің тәжірибесі көп ғасырлардан бері жиналған халық медицинасындағы бөлімін қазіргі заман технологияларымен біріктіруінің бір артықшылығы экономиялық тиімділігі.

Оңтүстік Шығыс Азия үнемі дәстүрлі медицина аймағындағы білімнің сақтаушысы болды, оның негізі табиғи дәрілік заттарды қолдану болып табылады. Бұл аумақтағы елдердің халық медицинасы өсімдік шикізатын оған минималды әсер ету арқылы дәрілік заттарды алуға негізделген.

Жүздеген жылдар бойы жоғарыкритикалық флюидті экстракция технологиясын енгізуде жиналған практикалық тәжірибе ерекше маркетингтік жолды қамтамасыз етті: өндірістік көлемде шығарылымды ұйымдастыру

кезінде дәстүрлік халықтық «брендтерді» анықтау және пайдалану, ал бірқатар жағдайларда - сапаның елеулі жоғарылауын тудыру.

1993 жылдың өзінде Үндістанда тамақ өнімдері өнеркәсібі процестерінің технологиялық өңдеулері бойынша Миссия жобаларының жұмыстары басталды. Аумақтық елдер мүддесінде Үндістан үкіметінің жоспарлауы бойынша комиссиялар: Шри – Ланка, Индонезия, Малайзия, Пәкістан, Бангладеш, Непал, Қытай және Үндістанның өзі болды. Сонымен қатар, өнеркәсіптің жеке салаларының мүддесінде бірқатар технологияларды енгізу жобалары қарастырылды. 9 жыл бойы жалғасқан зерттеулер негізінде (қалампыр, кардамон, тмин, имбирь, және т.б) дәмдік экстрактілерін және фармакологиялық экстрактілерді алуға бағытталған. Зерттеу барысында табиғи пестицидтер өндірісі, холестеринсіз тамақ өнімдерінің өндірісі, тамақ бояғыштары мен консерванттарды алу сияқты басқа да бағыттар қарастырылды.

Бұл жобалардың орындалуының нәтижесі болып, ЖКФ технологияларын қолданатын, әр түрлі шикізаттардан дайын өнімге дейін өндірістің толық циклін жүзеге асыратын коммерциялық фирмалар пайда болды. Мұндай кәсіпорындардың мысалы ретінде *Pioneer Enterprise* бола алады. Бірақ бұл жобалардың қатысушы – елдермен маңызды техникалық міндеті - өз өндірісінің жоғары қысымды насостарын шығару шешілмеді. Бұл жабдық батыс Еуропа елдерінде сатылып алынады, ал ол өндіріс құнын аздап қымбаттатады. Аумақтағы фирмалары шығаратын өнімдер Ресейде және шығыс пен батыс Еуропа елдерінде оңтайлы жүзеге асырылуда. Жоғары критикалық флюидті экстракция технологиясы Қытайда өте қарқынды дамуда. Үндістанда негізгі назар ЖКФ-ты тамақ құрамдастарын өндіргенде пайдалануға көзделсе, Қытайда фитофармацевтикалық препараттарды жасауға қолданылады.

Жоғарыкритикалық флюидті экстрактор органикалық еріткіштерді пайдаланбай қатты үлгілерден органикалық заттарды бөлу және концентрлеу үшін арналған, онда экстракциялауға тиімді ерітінді ретінде көміртек диоксидінің жоғарыкритикалық жағдайы: 32-100°C температура және 73-400 атмосфералық қысымды пайдалану қажет. Бұл әдіс экстракция уақытын он есеге дейін қысқартуға және экстракция процесін толық автоматтандыруға мүмкіндік береді.

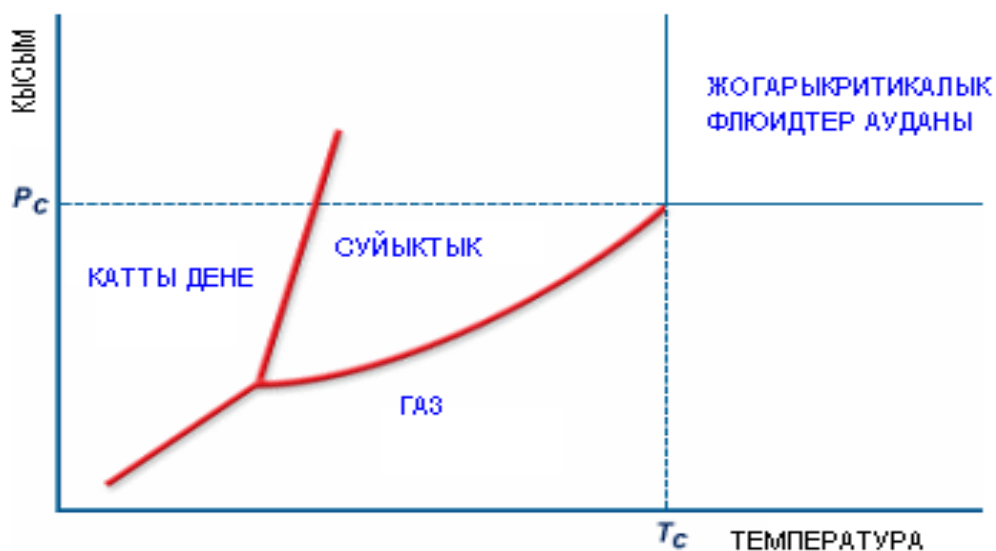
ЖКФЭ әдісі келесі заттарды экстракциялау үшін тиімді қолданылады: дизбендиоксидтер, полиароматты көмірсутектер, пестицидтер, қоршаған орта объектілерінен көмірсутекті отынның қалдықтарын, пластмассадан жасалған стабилизаторлар мен пластификаторларды, терпендердің, альдегидтердің, стероидтардың, майда еритін А, Е, К дәрумендерінің өсімдік шикізатынан жасалған дәрілік заттардың, радиоактивті элементтерді дезактивациялауда, нативті үлгілердегі ауыр металлдардың іздерін жоюда қолданылады.

Көп жағдайда ЖКФ-экстракциясында еріткішті регенерациялау үшін энергия тұтыну дәстүрлі экстракцияға қарағанда азырақ болады. Сонымен қатар жүйедегі артық қысым экстракция кезінде оттегінің өтіп кетуін алдын алады, қышқылдану процестерінің жүзеге аспауын қамтамасыз етеді. Мысалы, валериана тамырынан валеопотриаттар, түймедақ (проазулендері) және жусан

проазулендері немесе айырдан алынған лабильді сесквитерпенкетондар нативті күйде қандай да бір химиялық өзгеріссіз бөліне алады.

Жоғарыкритикалық параметрлер (кез келген температурада қысым 73,8 атм. жоғары болуы) жүйені қиындатады, себебі экстрагент жоғарыкритикалық жағдайға әкелініп қана қоймай, тек газ немесе сұйықтық фазасында емес, осылардың шекарасында анықталған параметрлерде экстракциялайтын ағын тудыру керек. Жоғарыкритикалық экстракцияның мүмкіншіліктері әлі де толық зерттелмеген, дегенмен қазірдің өзінде қызықты практикалық нәтижелер алынып жатыр.

Критикалық жағдайға дейінгі аудандарда (73,8 атм-дан төмен қысымда) көмір қышқыл газы сұйытылған жағдайда пайдаланылады. Бұл технологиялық жабдықтағы кейбір өзгешеліктерден басқа алынатын БАЗ-дың спектрінің жоғарыкритикалық параметрлермен салыстырғанда азаюын білдіреді, сонымен қатар экстракцияның бір циклін өткізуге қажетті уақыттың елеулі өзгеруін (4 сағаттан көбірек), мәні бойынша бұл сулы спиртті экстракция нұсқасына жақын, бірақта еріткіштің әсер ету ауданы едәуір кең келеді.



32 сурет - Жоғарыкритикалық флюидті экстракция параметрлері

Көмір қышқыл газымен экстракция Ресейде бұрыннан белгілі 60-жылдардың өзінде Краснодарлық және Мәскеулік Пехов пен Касьянов ғалымдарының қолдауымен CO_2 экстракторының өндірісі бойынша өндірістік цехтары ашылды. Әділдік үшін, CO_2 экстракциясының әлемдік тәжірибеде өндірістік пайдаланудан Ресейдің біріншілігін атап өту қажет. Ғалымдардың зерттеулері жоғарыкритикалық жағдайларда әртүрлі заттардың (шамамен 15) бірегей қасиеттерін анық зерттеді.

6-кесте. Кейбір газдардың жоғарыкритикалық жағдайға көшу параметрлері

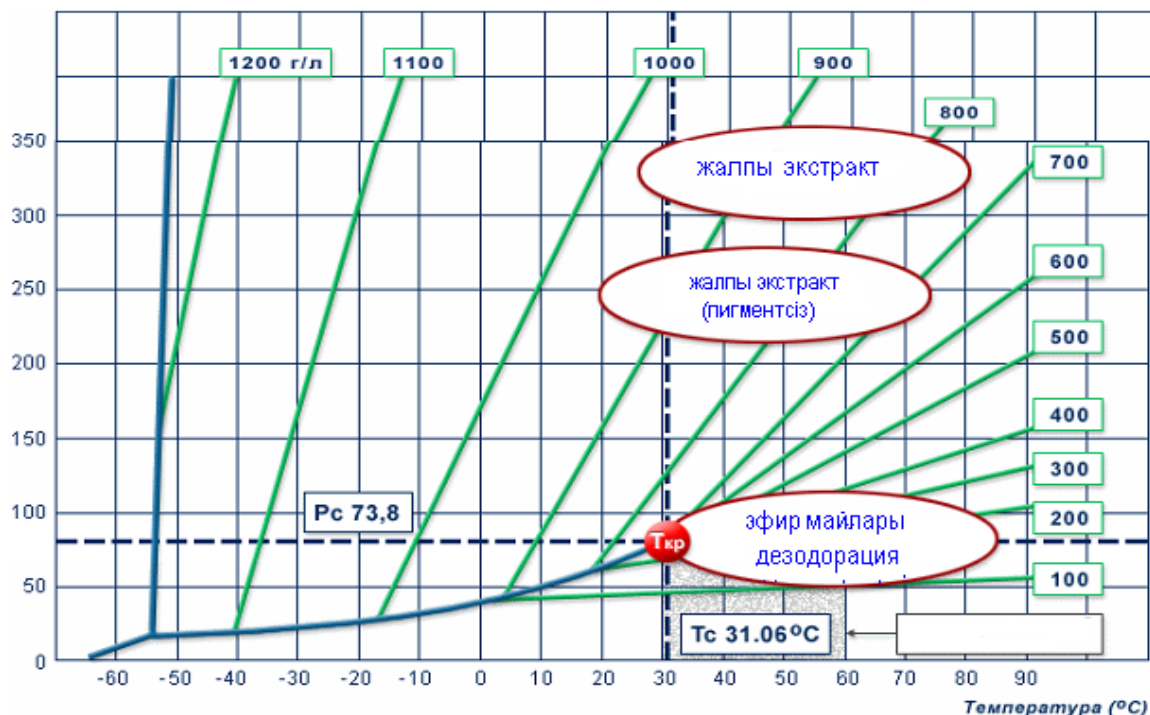
Газдың атауы	Критикалық нүктесінің температурасы (°C)	Критикалық нүктесінің қысымы (атм.)	Критикалық тығыздығы (г/см ³)
Трифторметан	25.9	46.9	0.52
Көмірқышқыл газы	31.0	72.9	0.47
Этан	32.2	48.2	0.2
Окись азота	36.5	71.7	0.46
Сернистый гексафторид	45.6	37.7	0.73
Пропилен	91.9	45.4	0.22

Жоғарыкритикалық газдардың жоғары экстрагирлеуші қабілеттілікке және сәйкес жағдайларда жеткілікті селективтілікке ие, экстракция кезінде де, бөлу процессі кезінде де, қысым мен температура шарттарын өзгерту арқылы экстрактідегі заттың концентрациясын реттеуге болады. Соңғы кезде жоғарыкритикалық газдар полимерлерді өңдеу облысында нанобөлшектерді қалыптастыруға, синтезді және биоматериалдарды алуда импрегнация және микрокеукті материалдарды жасағанда, металдар экстракциясында қолданылады. Қазіргі уақытта өнеркәсіп секторында жоғары критикалық технологияны шай, кофе, темекі өңдеу үшін, бастапқы шикізаттан бөлу мақсатында, сонымен қатар өнеркәсіптің сан алуан салаларында қолданыс табатын табиғи өсімдік экстрактілерін алу үшін пайдалануда ең көп табысқа ие.

Нақ осы жоғарыкритикалық параметрлері еріткіш ретінде алынған CO₂ газының селективтілігін шұғыл өзгертеді, яғни температура мен қысымның аздаған өзгерістерімен өсімдік туыстас табиғи шикізатты экстракциялау кезінде БАЗ толық алынуын қамтамасыз ете отырып, жоғарыкритикалық экстракция процессін реттеуге мүмкіндік береді.

2.6 Жоғарыкритикалық жағдайға дейінгі және кейінгі экстракция айырмашылығы

Екі жағдайда да көміртек диоксиді пайдаланатынына қарамастан, еріткіш өзін әр түрлі тұрпатта көрсетеді. Бұл ең алдымен 2 жүйедегі CO₂ еріткіштің әр түрлі тығыздықта болуымен түсіндіріледі. Жалпы ереже бойынша: еріткіштің ыдысы ерітіндінің тығыздығына байланысты. Мына суретте еру процесінің тек температура мен қысымға емес, біріншіден тығыздыққа тәуелділігін көрсетеді.



33 сурет - CO₂ газының еріту қабілетінің температура қысым және тығыздыққа тәуелділігі

Жоғарыкритикалық жағдайға дейінгі ауданда жүйе температурасын жоғарылатқанда CO₂ еріту қабілеті төмендейтіні байқалған. Шынында, жүйе температурасын жоғарыкритикалық жағдайға дейінгі ауданда жоғарылатқанда, CO₂ газының булануынан булы экстракция әдісін қозғалысқа әкеледі. Суреттен қысым мен температура функциясы ретінде CO₂ газының еріту қабілеттілігін одан да жоғарлатуға болатындығы көрсетілген. 2-суреттен ЖК ауданға дейінгі CO₂-нің максималды еріту қабілеті (70 атм. 300С параметрлерінде) орташа екенін көруге болады. Бірден тығыздықты көбейту жолымен CO₂ газының еріту қабілетін арттыру ықпалы туады, ол үшін тағы да қысым мен температураны жоғарылату қажет, ол өз кезегінде CO₂ газының жоғарыкритикалық жағдайына ауысуына алып келеді. Бірақ та CO₂ газының максималды еріту қабілеті бүкіл жоғарыкритикалық ауданда жатпайды. Бұл жағдайдағы еріту қабілетінің көрсеткіші ЖК ауданға дейінгі еріту көрсеткіштерінен әлдеқайда жоғары болғанымен, өте жоғары қысым мен температура қолданылатын ЖК аудандағы еріту көрсеткіштерінен өте төмен. Сонымен, соңғы уақытта жоғарыкритикалық CO₂-нің амин қышқылдарды еріту туралы (950-1200 атм. қысым) нақты мәліметтер пайда болды. Қазіргі кездегі қарапайым экстракция 250-ден 800 атм. дейінгі аралықта жүргізіледі.

Негізінде жоғарыкритикалық CO₂ және басқа да полярлы емес ерітінділердің арасында ешқандай айырмашылық жоқ, ендеше ЖК жағдайдағы негізгі ережелер CO₂ газына да қолданылады:

- еріткіш пен ерітін заттың физикалық және химиялық қасиеттері неғұрлым жақын болған сайын ерігіштік соғұрлым жоғары болады.

- полярлығы белгілі заттардың қатарында заттың молекулалық массасы жоғарылаған сайын заттың ұшқыштығы төмендейді. Еріту қабілетінің кез келген артуы берілген ерітетін заттың ерігіштігінің артуына ғана емес, сонымен қатар өлшенерлік көлемде еритін заттар қатары үшін бұл көрсеткіштің артуына алып келеді. Басқаша айтқанда еріткіш қоспаны құрайтын заттарды, жоғары еріткіш қабілеттілік кезінде сол еріткішті ерітудің төмен қабілеттілігіне қарағанда көбірек ерітеді.

Әлемде CO_2 экстракция технологиясының жағдайы туралы айтсақ. Бұл, біріншіден процесстің өзі жоғары сұранысқа ие болады және өндіріске пайдалануға ыңғайлы, көптеген өнімдер алуға мүмкіндік береді.

Егер температура белгілі бір мөлшерге өскен кезде, интенсификация процессінің әсерінен соңғы өнімнің көп мөлшерде бөлінуіне әкеледі, онымен қоса су мен көмірқышқыл газынан тұратын жүйе түзіледі, ол өз кезегінде өсімдік шикізаты құрамындағы кей компоненттері құрылымының өзгеруін тудырады. Ең жарқын мысалы ретінде түймедақтың CO_2 экстракциясын айтуға болады. ЖКФ ауданға дейінгі CO_2 экстракциясы кезінде хамазулендер жеткілікті көлемде бөлінеді, бұл дәстүрлі экстракциямен салыстырғанда жақсы нәтиже. Бірақ та хамазулен жоғары температура әсерінен ыдырау кезінде және түймедақтың хамазуленнен он есе артық алымды биологиялық белсенді компоненті болып табылатын матрицина су буының қатысуымен қалыптасады. ЖКФ аудандағы экстракция тұтас матрицинді экстракциялайды, бұл ЖКФ дейінгі экстракциямен салыстырғанда ЖКФ аудандағы CO_2 экстрактының нормаларын сәйкесінше төмендетуге мүмкіндік береді. Басқа зерттеу жұмыстары да осындай нәтижелер көрсетеді, бірақ бөлінетін заттар спектрінде елеулі айырмашылықтар бар, мысалы: флавоноидтар. ЖКФ ауданға дейінгі экстракция кезінде олар тым аз мөлшерде алынған болса, ЖКФ аудандағы экстракция кезінде оларды бастапқы өсімдік шикізатында болатын түрі мен көлемінде алуға мүмкіндік береді. Әлбетте, мұндай ұйғарымды барлық флавоноидтарға жатқызуға болмайды, бірақ ЖКФ экстракциясының технологиясы кверцетинді де, рутинді де алуға мүмкіндік береді.

Енді әлемдегі және Ресейде жүргізілген ЖКФ дейінгі және ЖКФ аудандардағы экстракциялардан алынған экстракттардың химиялық құрамын қарайтын болсақ:

7-кесте. ЖК ауданға дейінгі және ЖК жағдайдағы еріткіштердің еріту қабілет

№	Заттар	ЖК ауданға дейінгі	ЖК аудандағы	ЖК ауданда
1	Каротиноидтар			
2	Диглицеридтер			
3	Моноглицеридтер			
4	Стериндер			
5	Фосфолипидтер			
6	Токоферолдар			
7	Терпеноидтар			
8	Альдегид, кетондар			
9	Күрделі эфирлер			
10	Флаван агликондар			
11	Спирттер			
12	Органикалық қышқылдар			
13	Алкалоидтар			
14	Тері илегіш заттар			
15	Фенолды қосылыстар			
16	Гликозидтер			
17	Минералды заттар			
18	Амин қышқылдары			
19	Полисахаридтер			
20	Олигосахаридтер			
21	Ақуыз, пептидтер			
22	Пектиндер			

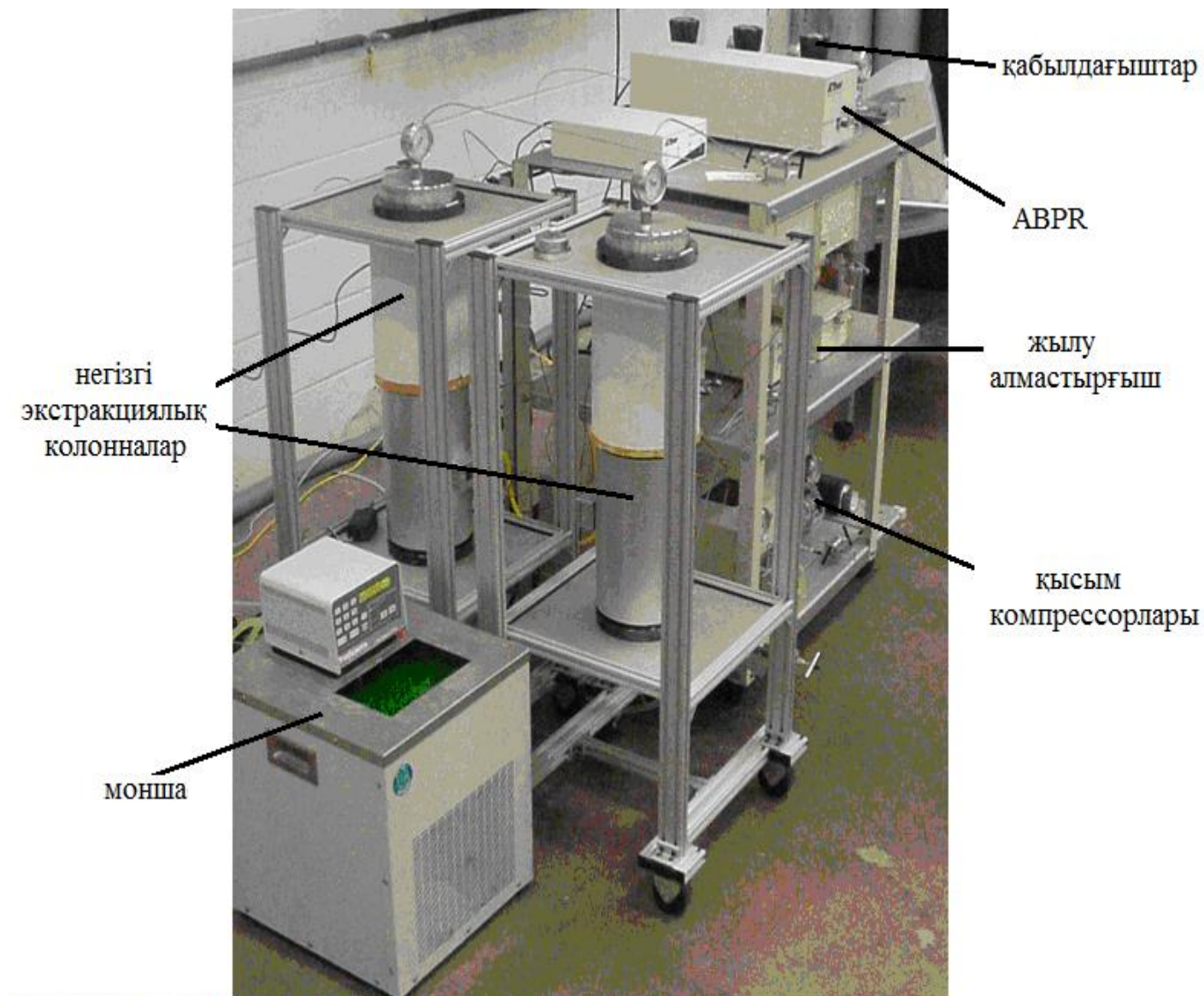
Жоғарыда айтылғандай ЖКФ процесс жағдайы басқарылады, ол өсімдік шикізатынан алынатын қандай да бір компоненттің экстракциясын реттеуге мүмкіндік береді. Бұл үшін бірнеше жол бар: тізбекті орнатылған экстракт жинақтаушылардағы уақытша фракциялау және параметрлерін өзгерту. Дәл осы жол тек қана табиғи антиоксиданттар, консерванттар, бояғыштар, дәмдеуіш заттар сияқты табиғи азықтық ингредиенттерді ғана емес, сонымен қатар фармацевтикалық компоненттерді де алуға мүмкіндік береді.

Біздің елімізде ЖКФ экстракция әлі жеткіліксіз даму сатысында. ЖКФ дейінгі экстракция процесі өсімдік майларын, косметикалық ингредиенттерді алу кезінде өте тартымды болуы мүмкін. Азықтың функционалдық ингредиенттер туралы айту қиындау, ал фармацевтикалық құндылықтар туралы, тек ароматерапия аспектісінде айтуға болады.

Зерттеуге арналған құрылғы: ЖКФ–экстрактор.

Экстрактор:

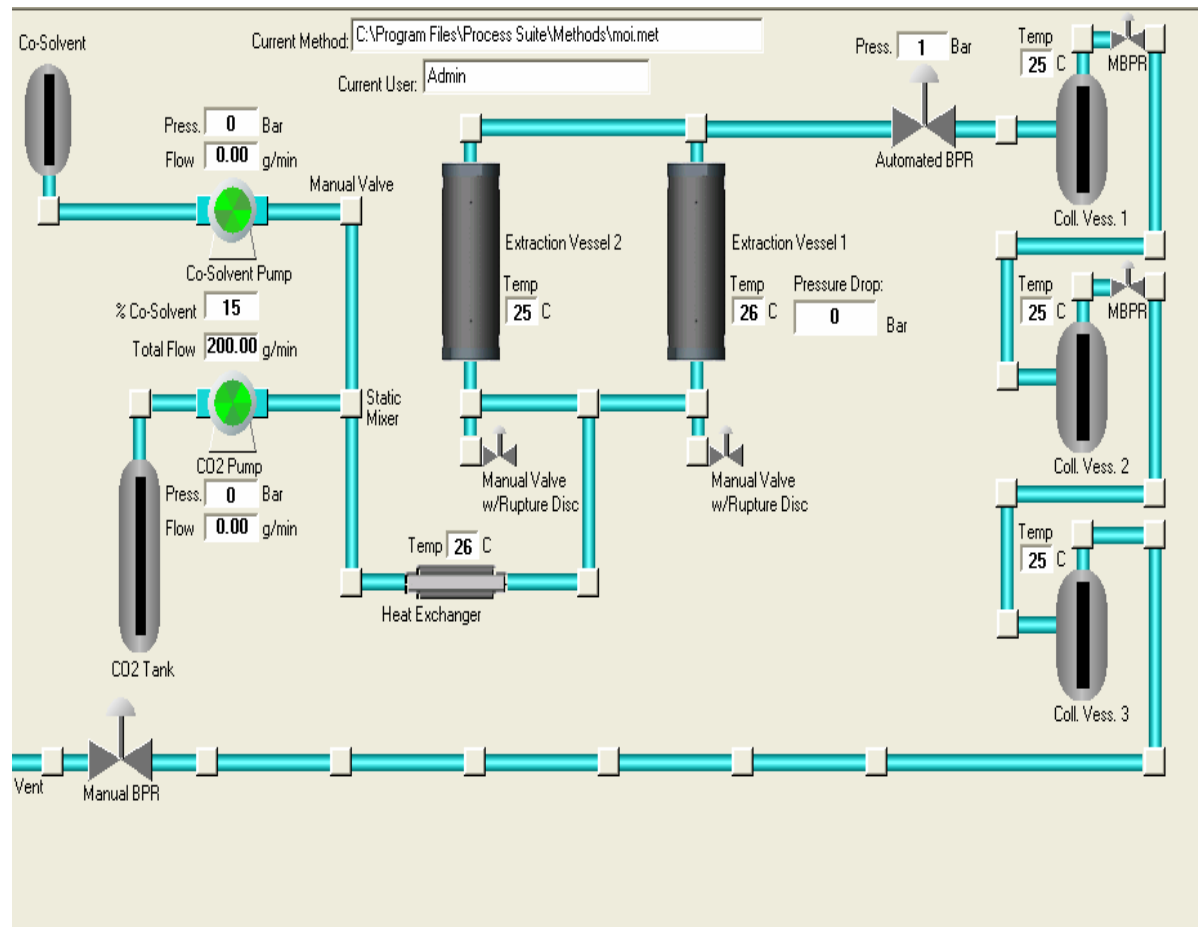
1. автоматты түрде қысым реттейтін құрылғы (*ABPR*)
2. жоғары қысымды қосымша еріткіш насосы (*P-50 High pressure pump*)
3. жоғары қысымды көмірқышқыл газының насосы (*P-200 High pressure pump*)
4. арнайы жоғары қысымды реактор (*Vessel №1 Vessel №2*)
5. экстрактты жинақтайтын және фракциялайтын жоғары қысымды цилиндр (*Vessel №1 №2, №3*)
6. монша



34 сурет - Көлемі 2x5л Жоғарыкритикалық экстрактор, Thar (АҚШ).

1-сызбаныұсқа - Жоғарғыкритикалық экстрактордың сызбанұсқасы

1. Co-Solvent – сулы спирт ерітіндісі
2. CO₂ Tank – CO₂ газының баллоны
3. CO₂ Pump – CO₂ газының насосы
4. Co-Solvent Pump – қосымша еріткіш насосы (сулы спирт ерітіндісі)
5. Static Mixer – араластырғыш
6. Heat Exchanger – жылу алмастырғыш
7. Manual Valve – механикалық кран
8. Extraction Vessel 2 – арнайы жоғары қысымды реактор
9. Extraction Vessel 1 – арнайы жоғары қысымды реактор
10. Collecting vessel 1,2,3 - экстрактты жинақтайтын және фракциялайтын жоғары қысымды цилиндр (1,2,3)



Жұмыс барысы:

1. Шикізатты ұсақтау
2. Шикізатты арнайы дайындалған ситоға толтыру
3. Арнайы жоғары қысымды реакторға енгізу
4. Жүйенің герметикалығын тексеру
5. Компьютерге зерттеу жүргізілетін параметрлерді енгізу
6. CO₂ газын жүйеге жіберу
7. Процесті жүргізу:
 - 1) Экстракциялаушы газ – CO₂ газы
 - 2) Моншаға арналған суытқыш агент – этиленгликоль
 - 3) Қосымша еріткіш – этил спиртінің 10% ерітіндісі
 - 4) Жүйеге берілген қысым – 100-400 bar
 - 5) Жүйе жоғарғы критикалық экстракторға берілетін жалпы ағынының жылдамдығы 100-150 г/мин: CO₂ газы үшін – 85-127.5 г/мин, этил спиртінің сулы ерітіндісі үшін – 15-22.5 г/мин.

Жүйе температурасы: арнайы жоғары қысымды реактор үшін – 40°C, экстрактты жинақтайтын және фракциялайтын жоғары қысымды цилиндр – №1 - 45°C №2 - 30°C №3 - 30°C. Шикізат ретінде алдын-ала кептірілген *Climacoptera subcrassa* өсімдігі алынды, ұзындығы 5-7 мм дейін ұсақталды. Арнайы жоғары қысымды реактор диаметрін өлшеп, оның іші ластанбайтындай етіп сито дайындалды, ситоның ішкі бөлігіне шикізатты нығыздап салынды, шикізаттың жалпы салмағы – 1 кг. Реактордың үстіңгі бөлігін нығыздап жабылып, реактор жүйеге жалғанды. Осы параметрлерде экстракция процесі 1.5-2 сағат жүргізілді.

Жоғары критикалық флюидті экстракция нәтижесінде алынған экстракттың сапалық құрамын анықтау үшін қағазды және жұқа қабатты хроматография қолданылды.

2.7 Жоғары эффективті сұйықтықтық хроматография (HPLC)

Жоғары эффективті сұйықтықтық хроматография (ЖЭСХ) әдісі талданылатын заттың аз мөлшерін талап ететін тез, жақсы қайталанғыштық әдіс болып табылады және мөлшерлік және сапалық талдау мен препаративті бөліну үшін қажет.

Флавоноидтар үшін ең көп қолданылатыны айналмалы - фаза сорбентті (RP-8; RP-18) бағандары және толқын ұзындығы ауыспалы детектордың УК-көріну көмегімен детектрлеу. Қазіргі кезде фотодиодты детекторы кеңінен қолданылады, хроматограммада шарықтың бөліну кезінде осы шыңға тиесілі заттың УК-көріну спектрін алуға мүмкіндік береді. Мұндай тәжірибелік тәсіл заттарды сәйкестендіру тапсырмаларын айтарлықтай жеңілдетеді.

Қозғалмалы фазалар (элюентті жүйелер), әдеттегідей бинарлы болып келеді және оның құрамында қышқылды полярлы компоненттерді құраушы (сіркесуының, перхлордың, фосфордың және құмырсқа қышқылының су ерітінділері) мен полярлығы аз органикалық еріткіштер (метанол мен

ацетонитрил) болады. Қозғалмалы фаза хроматографиялық процесс барысындағы уақытта қозғалмалы фазаның салыстырмалы құрауыштарының өзгеруі болған жағдайда мұнараға изосынды және градиентті тәртіпте де түсуі мүмкін.

Градиентті тәртібі флавоноидтардың күрделі қоспаларын бөлу үшін жарамды. Айналмалы - фаза сорбентті мұнаралар үшін ұқсас градиентті бағдарламалары полярлығы аз еріткіштің үлесі әрі қарай шамалап өсуімен полярлы еріткіш үлесінің стартының басымдылығына негізделген. Хроматограммадағы шыңның оған «тиесілі» заттың қатысты болуы едәуір қиын тапсырма болып табылады. Ыңғайлы тәсілі болып стандартты үлгілер мен олармен салыстырылатын зерттеу нысанының хроматограммасы деп аталатын жақсы танымал параллельді хроматографиялауды қолдану болып табылады. Стандарттық зат мінсіз күйде флавоноидтармен өте ұқсас болуы тиіс және оған ұқсас хроматографиялық қасиеттерге ие болуы керек. Егер стандартты зат тең жағдайда, бірақ параллельді болып хроматографияланатын болса, онда оны сыртқы стандарт деп атайды. Ішкі стандарт (хроматографқа енгізу алдында зерттелінетін сынамаға қосылады) келесі талаптарға жауап беруі тиіс: зерттелінетін қоспада ұқсас зат болмауы тиіс және стандарт шарығы қоспадағы қандай да бір қосылыстармен бөгелмеуі тиіс. Мұндай шектеулер сыртқы стандартты қолданған жағдайда болмайды.

Флавоноидтар үшін стандартты зат ретінде көбінесе коммерциялық тұрғыдан қол жетімді болып табылатын кверцетин, кемпферол, лютеолин, рутин қолданылады. Ол флавонолды гликозидтердің мөлшерлік талдауында өте ыңғайлы. Қоспада басқа флавоноидтары бар флавоныды гликозидтер үшін - апигенин-7-глюкозид, флаван-3-олдар үшін - катехин, дигидрофлавоноиддар үшін - нарингенин, дигидрофлавоноиддар үшін - дигидрокверцетин, изофлавоноиддар үшін - даидзеин секілді коммерциялық қол жетімді стандарттар қолданылады.

Мөлшерлік талдау үшін зерттелетін қоспаның қатынасына қарай қолданылатын, сол бір хроматографиялық күйдегі (толқын ұзындығы, еріткіші) әр стандарт үшін шарық алаңынан флавоноид концентрациясының қисық байланыстылығы арқылы құралады. Сәйкес мөлшерлегіш қисықтар хроматограмманың ЖЭСХ әр шарығымен көрсетілетін флавоноидтар санын есептеу үшін қолданылуы мүмкін. Қазіргі уақытта шың алаңын компьютерлік жүйемен есептеудегі хроматографтарды қамтамасыз етумен байланысты мөлшерлегіш қисықтарды құрудың қажеттілігі қамтамасыз етіледі. Хроматографиялау мысалы ретінде айналмалы - фаза нұсқасында флавоноиддар мен флавоноиддардың қоспалары, онда флавоноидтардың шығу тәртібі гидроксил тобының санымен корреляцияланады, соның ішінде: ұстап тұру уақыты молекуладағы гидроксил топтар санының ұлғаю шамасы бойынша өседі.

Жалпы флавоноид кешенін алу үшін ЖЭСХ сипаттамасы және әдістер

ЖЭСХ- әдісі DIONEX соңғы 3000 жүйе ЖЭЖХ (Thermo-Фишера, USA) колонкада ұштастыра: Sunfire C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм) (Waters, USA), қорғаулы колонкада: Sunfire C18, 4.6x20 mm, 5 мкм (Waters, USA) қолдана отырып жүргізілді.

Қозғалмалы фаза: А: Метанол

D: 0,1% (айн/айн) сулы құмырсқа қышқылы (НСООН).

Жалпы флавоноидтарды өндіру және бөлу үшін келесі шайырлар қолданылды:

Макрокеуекті шайыр АВ-8, Д 101, НРD-100, ПГП-300, НРD-400, ПГП-450, ПГП-500, LD601, LS-303 В және LX-28.

Қозғалмалы фаза: Н₂O, 30-80% этанол.

ЖЭСХ құрылғының сипаттамасы

Аппарат төрт бөліктен тұрады:

- Ultimate 3000 сорғы
- Ultimate 3000 үздіксіз автоматты сынама алғыш
- Ultimate баған бөлімше
- Ultimate 3000 Variable толқын ұзындығы Detector
- Бағдарламалық қамтамасыз ету: Chromeleon нұсқасы 7.2

Стандартты еркіштерді және үлгіні дайындау

Әрбір стандартты ерітінді 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 мг/мл концентрациясында дайындалды. 100 г *Climacoptera.subcrassa* текті өсімдігін 400 мл 70% -этанолдан 48 сағат бойы бөлме температурасында өндірілген. Алынған экстракт сығындысын петролейн эфирмен жуып сүзеді және түссіз болғанша үрдісті бірнеше рет қайталайды. Нәтижесінде алынған 15 мг құрғақ сығынды ЖЭСХ -да талдау үшін пайдаланылды және тиімді жүйе таңдау үшін келесі әдістер қолданылды.

1-әдіс

Колонка: Sunfire C18, 4.6×250 мм, 5 μм (Су, АҚШ) және қорғаныш бағаналы колонка Sunfire C18, 4.6×20 мм, 5 μм (Су, АҚШ) көмегімен жүзеге асты.

Қозғалмалы фаза: С: ацетонитрил, D: (0.1% v/v) құмырсқа қышқылының судағы ертіндісі (НСООН).

Градиент: уақыт (мин)	% С	% D
5	8	95
69	40	60
80	40	60

шығым: 1 мл / мин
 айдау көлемі: 10 мкл
 температура: 35 °С
 УФ детекторы: 254 нм
 шикізат: экстракт (20 мг / мл)

2-әдіс

Колонка: Sunfire C18, 4.6×250 мм, 5 μм (Су, АҚШ) және қорғаныш бағаналы колонка Sunfire C18, 4.6×20 мм, 5 μм (Су, АҚШ) көмегімен жүзеге асты.

Қозғалмалы фаза: С: ацетонитрил, D: (0.1% v/v) құмырсқа қышқылының сулы ертіндісі (НСООН).

Градиент: уақыт (мин)	% С	% D
0	8	95
50	76	24

шығым: 1 мл/мин
 айдау көлемі: 10 мкл
 температура: 35 °С
 УК детекторы: 254 нм
 шикізат: экстракт (20 мг/мл)

АВ-8 макрокеукті шайыр көмегімен *Climacoptera* текті өсімдіктен алынған биологиялық белсенді кешеннен, таза флавоноидтың қоспасын алу және бөлу жолдары

Сонғы жылдары биологиялық белсенді кешендерді бөлуге, тазалауға көптеген шайырларды пайдалану қызуғышылық тудыруда. Жалпы флавоноидты қоспаны биологиялық белсенді кешеннен бөлу үшін әртүрлі макрокеукті шайырлар қолданылады, олар: АВ-8, НРD-100, НРD-300, НРD-400, НРD-450, НРD-500, LD601, LS-303В, LX-28, және D101. Шайырлар жайлы мәлімет 26-суретте және 33- кестеде келтірілген.

8 кесте - Әр түрлі макрокеукті шайырлардың статистикалық адсорбция және десорбциясы

Шайыр турлері	Полярлы ғы	Нақты бетінің ауданы (м ² /г)	Орташа диаметрі саңылаулары	Адсорбция (мг/г)	Адсорбция жылдамдылығы (%)	Десорбция (мг/г)	Дес. жылд. (%)
НРD-400	Полярлы	500~550	7.5~8	16.03	46.04	12.07	75.25
НРD-	Полярсыз	650~700	9~10	20.23	56.81	14.86	73.43

100							
HPD-300	Әлсіз полярлы	800~870	5~5.5	23.28	65.67	16.08	68.79
HPD-500	Күшті полярлы	500~550	5.5~8	21.62	62.72	15.56	71.96
HPD-450	Әлсіз полярлы	500~550	9~11	14.57	40.93	10.76	73.84
D101	Полярсыз	400~600	9~11	16.14	45.33	12.02	74.46
LD-601	Күшті полярлы	90~120	25~30	28.98	81.39	10.89	37.58
AB-8	Әлсіз полярлы	480~520	13~14	15.39	37.60	12.08	72.85
LS-303B	Полярсыз	500~560	5.5~8.5	13.21	45.32	12.23	65.36
LX-28	Әлсіз полярлы	450~500	7~9	16.42	52.32	11.16	62.24

Сонын ішінде макрокеуекті АВ-8 шайыры қарқынды даму үстінде. ТСН АВ-8 макрокеуекті шайыр полярсыз жоғары меншікті беткі құрылымы бар, кең ауқымды адсорбциялық қасиетке ие. Ең алғаш өсімдік әлемінде стевия жапырағынан қантты алу үшін пайдаланған.

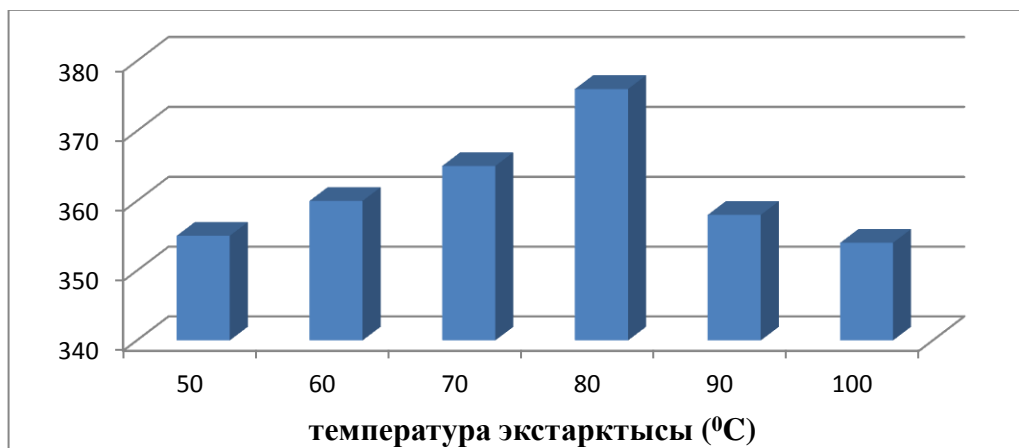
Қазіргі таңда тек қана өсімдіктен биологиялық белсенді зат алу үшін ғана емес, сонымен қатар нарық заманында жаңа заттарды өндіруге қолданылуда.

Climacoptera. subcrassa – өсімдігінен жалпы флаваноид кешенін таза бөліп алу үшін АВ-8 макрокеуекті шайыр қолданылды. Жалпы биологиялық белсенді кешеннің стастикалық адсорбция және десорбция үдерісі АВ-8 макрокеуекті шайырда оңтайландырылды. Биологиялық белсенді кешеннен флаваноид қоспасын таза күінде алу үшін тиімді элюентті табу қажет, ол үшін әр түрлі еріткіштер іздестіріліп; рН-5, адсорбция уақыты 2 сағат, 30% және 70%-этанол пайдалана отырып, десорбция уақыты 4 сағат, ағынның жылдамдығы 10 мл/мин оңтайлы жағдай деп ұйғарылды.



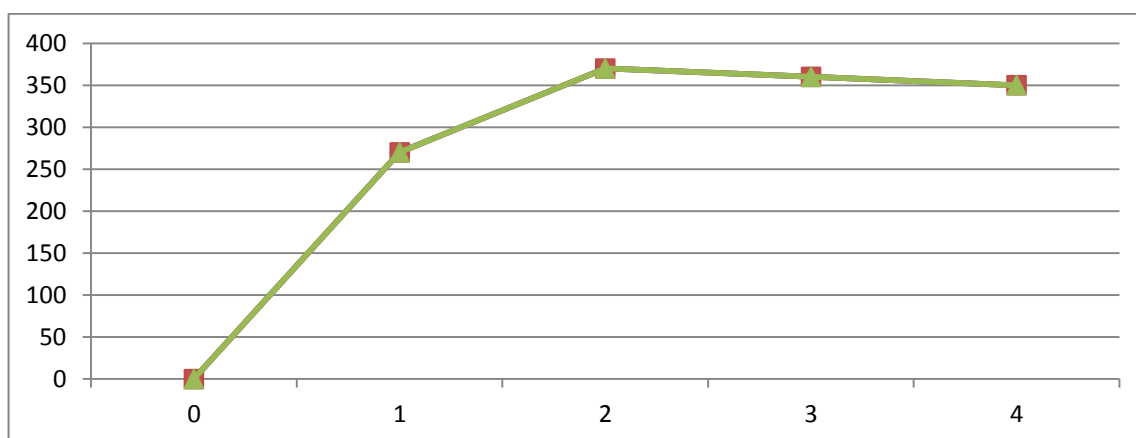
35 сурет - Экстракт сығындысынан жалпы флаваноид кешенінің бөлінуіне макрокеуекті шайырдың әсері

Экстракт сығындысы флавоноидтардың жалпы мөлшерінің температураны 80 °С дейін көтеру арқылы ББК-ның мөлшері ұлғайтылды, сондай-ақ осы нәтижелер жоғарғы температурада ерігіштік қабілетіне және еритін заттың диффузияға байланысты деп есептелді. Нәтижелер 36-суретте көрсетілген.



36 сурет - Жалпы флавоноидты қоспаны ББК-нен бөлу үшін температураның әсері

Оңтайлы өндіру шарттарын пайдалану арқылы 1-4 уақыт аралығында экстракт шығымы қарастырылды. Экстракт сығындысының шығымын өндіру уақыты шамамен 2 сағат аралығында флавоноид кешеннің мөлшері ұлғайды ал, уақытты ары қарай көтеру барысында ешқандай өзгеріс байқалған жоқ. Полифенолдың мөлшері экстракция уақытына айтарлықтай әсер етпейді. Осылайша, оңтайлы өндіру уақыты 2 сағат болып табылды. Нәтижесі 28-суретте көрсетілген.

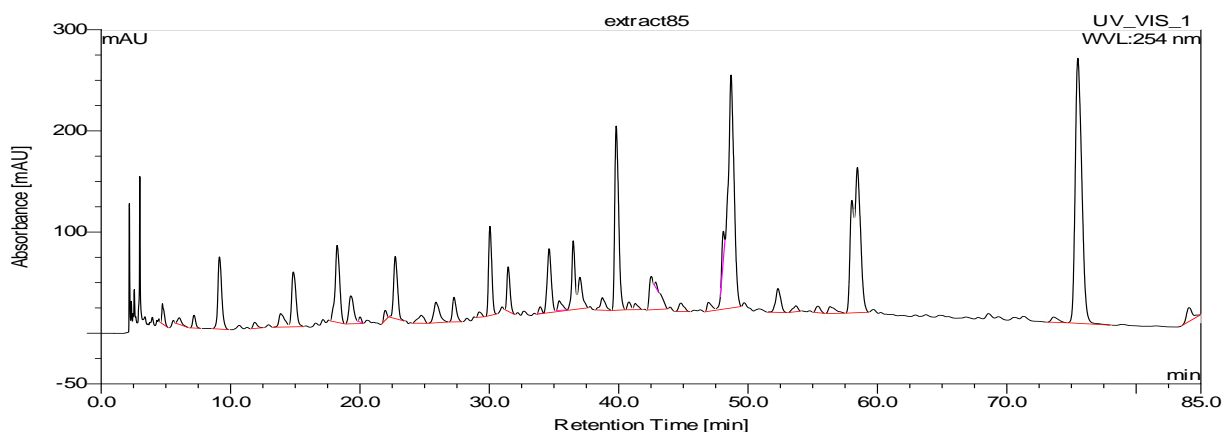


37 сурет - Жалпы флавоноидты қоспаны алуға уақыттың әсері

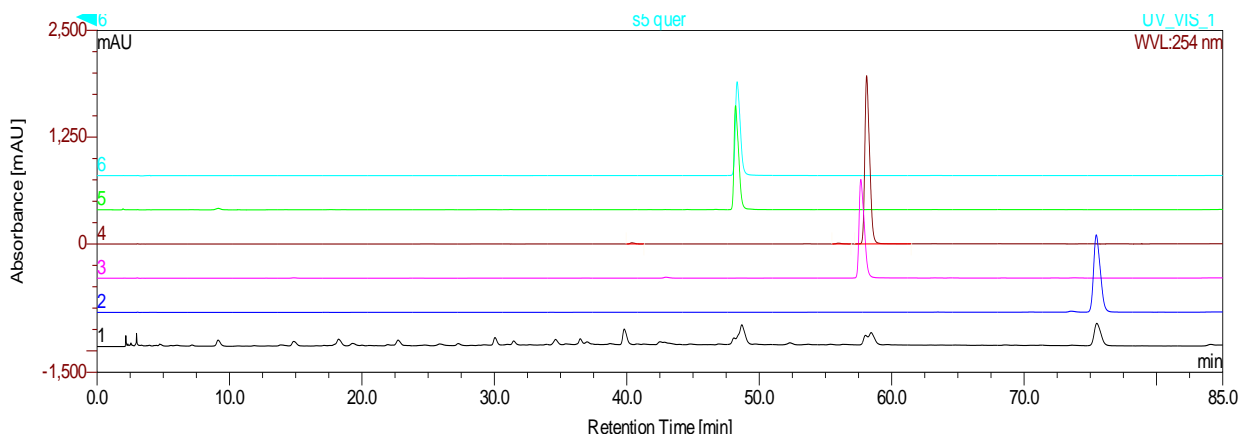
ЖЭСХ көмегімен оқшауланған флавоноидтардың сандық талдау

Флавоноидтар табиғи полифенол қосылыстардың үлкен топтамасы. Соңғы жылдары флавоноидтардың физиологиялық белсенділікке қатысты көптеген зерттеулер жүргізілген соның ішінде тотығуға қарсы эффект жайлы айтылған. *Climacoptera* текті өсімдіктің жер үсті бөлігінен флавоноид кешенінің сапалық құрамын анықтау үшін хроматографиялық әдістер (ЖҚХ, ЖЭСХ) және спектрофотометр қолданылды. Нәтижесінде ЖЭСХ хроматографиялық әдіс арқылы 8 флавоноидтың нақты сипаты анықталды олар: лютеолин, кемпферол, кверцетин, диосметин және кверцетиннің 3-О-метокси, кверцетиннің 3-О-β-D-глюкопиранозиді, кверцетиннің 7-О-β-D-глюкопиранозиді, кверцетиннің 3-О-β-D- глюкопиранозиді.

38-суретте көрсетілгендей 15 мг құрғақ шикізатқа талдау жүргізі отырып, нәтижесінде ЖЭСХ хроматограммасын алдық. Ары қарай экстракт шыңдарын анықтау үшін стандартты үлгілер қолданылды (39 -сурет).



38 сурет - *C.subcrassa* 70% -этанолдың ЖЭСХ хроматограммасы

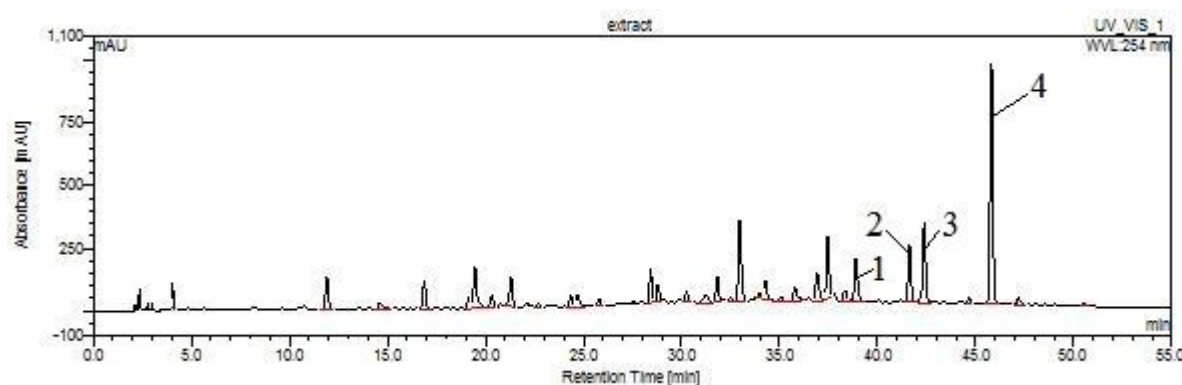


39 сурет - *C.subcrassa* 70%-этанолдың ЖЭСХ хроматограммасы (1-сызық) және 4 стандарттар (2-сызық, 3-сызық, 4-сызық және 5-сызық)

Зерттеу нәтижесінде ұсталу уақыты бойынша 48 минутта лютеолин және кверцетинді ал RT -58 минутта диосметин және кемпферол шыңдарын көрсетті. Бірақ біз осы әдіспен сығындыдан оқшауланған флавоноидты

анықтай алмаймыз, сол себепті 2-әдісті қолданамыз (тәжірбиелік бөлімде келтірілген).

2-әдіс арқылы ЖЭСХ -да 50 минут аралықта экстракт сығындысынан оқшауланған флавоноидтың жақсы бөлінгенін байқауға болады (40 – сурет көрсетілген).



40 сурет – *Climacoptera* өсімдігінің 70%-этанол сығындысы, элюенттер: метанол - 0,1% HCOOH сулы ертіндісі 8:92 - 78:22 (0- 50 мин), ағу жылдамдығы: 1 мл мин; УК- 254 нм

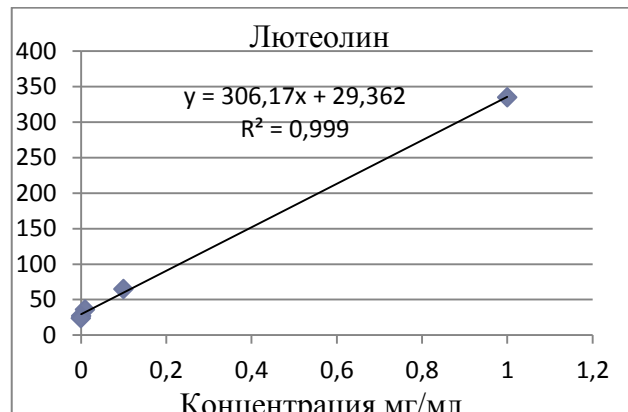
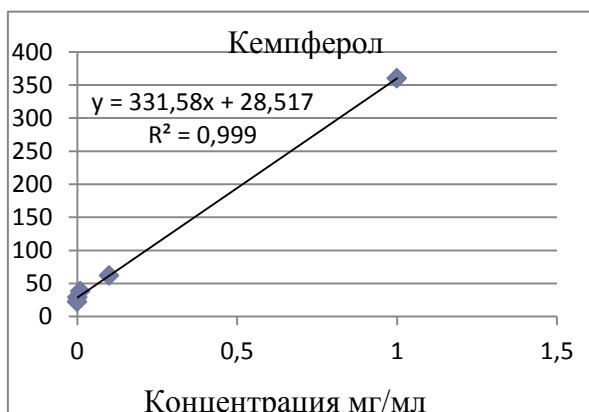
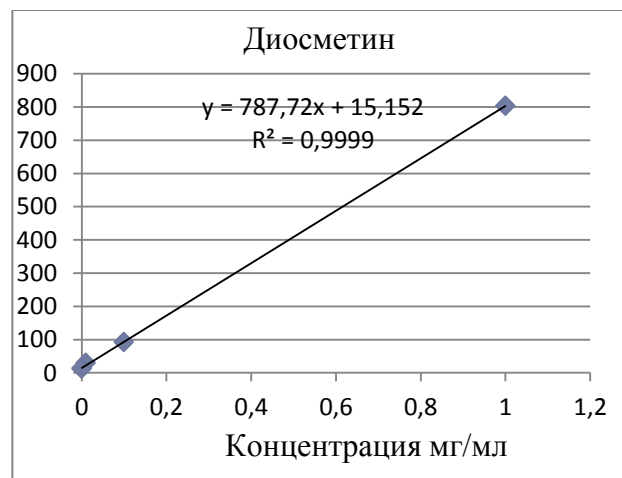
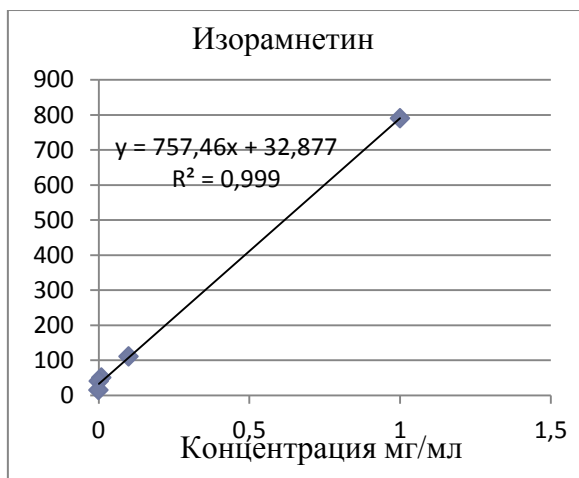
ЖЭСХ жылжымалы фазада метанол және сірке қышқылының сулы ертіндісімен 1 мл/мин ағу жылдамдығында $R_t = 38,7$ (лютеолин 54,2: 45,8 айн / айн), $R_t = 41,6$ (кемпферол, 58,3: 41,7 айн/айн), $R_t = 42,5$ (диосметин 59,5: 40,8 айн/айн) және $R_t=45.7$ (изорамнетин 63.2:36.7 айн/айн) оңтайлы бөлу көрсеткіштерін көрсетті. Үлгі көлемін 10 мкл және стандарт ертіндісін 10 мкл енгізілді. Толқын ұзындығының детектрі 254 нм ал, температурасы 35°C орнатылған. 40-суретте көрсетілгендей элюентті және градиент уақытын ауыстыру арқылы таза оқшауланған флавоноидтың бөлінгені анықталды.

Бөлінген флавоноидтардың шыңдары бастапқы стандарттардың уақытта ұсталуы бойынша салыстыру тәсілімен анықталды. Содан кейін, экстракт құрамында бөлінген флавоноидтың мөлшерін анықтау үшін калибрлік қисық тұрғызылды. Ол үшін стандартты ертіндіні үлгіге қосып, олардың шыңдары жиілігін ұлғайту арқылы анықталды. Бұл тәсіл әрбір стандартқа бөлек жүргізілді. Калибрлік қисық тұрғызу үшін 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 мг / мл стандартты ертінді дайындалды.

Калибрлік қисық тұрғызу үшін біз стандартты ертінді ретінде *Climacoptera* текті өсімдіктен таза күйінде бөлінген лютеолин, кемпферол, диосметин және изорамнетин қолданылды.

Алынған стандартты ертінділердің аудан шыңдары (y) экстракт мөлшерімен (15 мг/мл) анықталды. Лютеолин үшін регрессия теңдеуі $y=306,17x + 29,362$ ($R^2=0,999$); кемпферол үшін: $y=331.58x + 28,517$ ($R^2=0,999$); диосметин үшін: $y=787,72x + 15,152$ ($R^2=0,999$) және изорамнетин үшін: $y=757,46 x + 32,877$ ($R^2=0,999$). Стандартты ертінді ретінде алынған 4 флавоноид 70%-этанол экстракттыдағы (мг/мл) әр бір теңдеу бойынша есептелді. (0,0001 ден 1 мг/мл) концентрация бойынша лютеолин, кемпферол,

диосметин және изорамнетиннің калибрлік қисықтары 41- суретте келтірілген.



41 сурет -0,0001- ден 1 мг/мл концентрация бойынша лютеолин, кемферол, диосметин және изорамнетиннің калибрлік қисықтары

Лютеолин, кемпферол, диосметин және изорамнетин үшін калибрлік қисығы 0,0001-1,0 мг/мл концентрациялары аралығында тұрғызылды 41-суретте көрсетілген. Алынған қисық тәжірибелік нүктелердің барлығы дерлік бір сызықтың бойында жататындығын көрсетті. Калибрлік қисықтары стандарттар үшін қолданылатын концентрациялар аумағында бірізділікті көрсетті. Біз әр теңдеуден 4 қосылыстың құрамын есептеп шығарамыз. Стандартты ерітінділер енгізілген соң, алынған қисықтар өте жақсы сызықтық корреляция коэффициентіне (R) ие болды.

Флавоноидтардың мөлшерін анықтау

Лютеолин үшін регрессия теңдеуі: $y=306.17x+29.362$; $x=y - 29.362/306.17$; $x=35-29.362/306.17$; $x=0.02$ мг/мл.

Кемпферол үшін регрессия теңдеуі: $y=331.58x+28.517$; $x =y - 28.517/331.58$; $x=42-28.517/331.58$; $x=0.04$ мг/мл.

Диосметин үшін регрессия теңдеуі: $y=787.72x+15.152$; $x = y - 15.152/787.72$; $x=57-15.152/787.72$; $x=0.05$ мг/мл.

Изорамнетин үшін регрессия теңдеуі: $y=757.46 x+32.877$; $x=y - 32.877/757.46$; $x=156-32.877/757.46$; $x=0,16$ мг/мл.

Мұндағы:

y =стандарттың аудан шыңы, x =стандарт ерітіндегі концентрация (мг/мл).

9 кесте – *Climacoptera* өсімдіктің 70% - этанол сығындысынан бөлінген лютеолин, кемпферол, диосметин және изорамнетиннің сандық сараптау

Заттар	Ұстау уақыты (min)	Калибрлеу функциясы	R ²	Мөлшері (%)
Лютеолин	38.7	$y= 306.17 x+29.362$	0.999	0.13
Кемпферол	41.6	$y = 331.58x+28.517$	0.999	0.26
Диосметин	42.5	$y = 787.72x+15.152$	0.999	0.33
Изорамнетин	45.7	$y = 757.46x+32.877$	0.999	1.06

9 - кестеде көрсетілгендей, *Climacoptera subcrassa* текті өсімдіктің 70% - этанол сығындысынан бөлінген флавоноидтың жинақталу бойынша диосметин мен изорамнетин мөлшері көп екені анықталды.

Орташа нәтиже (x) жеке нәтижелердің қосындысынан алынған нәтижені жеке мәндер санына (n) бөлу арқылы анықталды:

$$x = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + x_5}{n} \quad (1)$$

Стандартты ауытқу төмендегі теңдеумен есептелді:

Стандартты ауытқу:

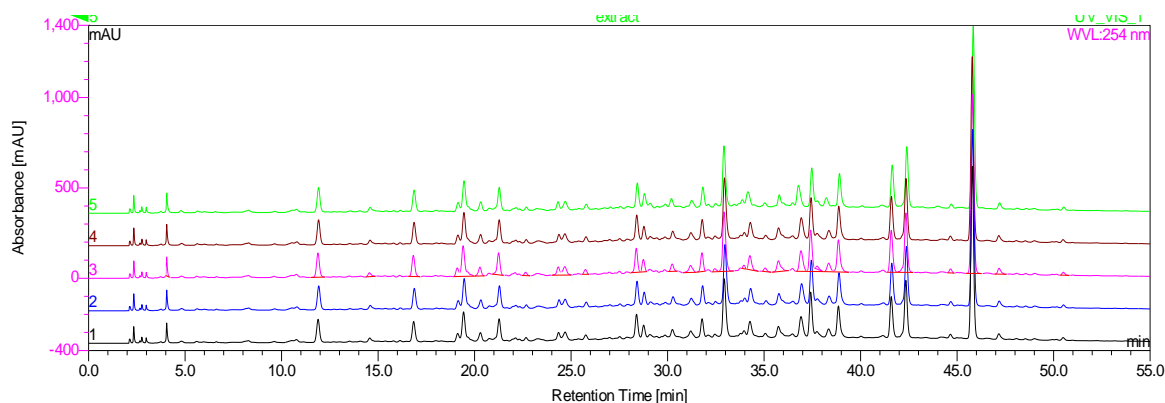
$$CA = \sqrt{\frac{(x_1 - x)^2 + (x_2 - x)^2 + (x_3 - x)^2 + \dots}{n - 1}} \quad (2)$$

Салыстырмалы стандарты ауытқуды (ССА) есептеу әдетте ыңғайлы. Оның шамасы пайызбен өлшеніп, стандарты ауытқуды 100-ге көбейтіп,

алынған нәтижені орташа стандартты ауытқу шамасына бөлу арқылы анықталды:

$$CCA = 100 \frac{CA}{X} \quad (3)$$

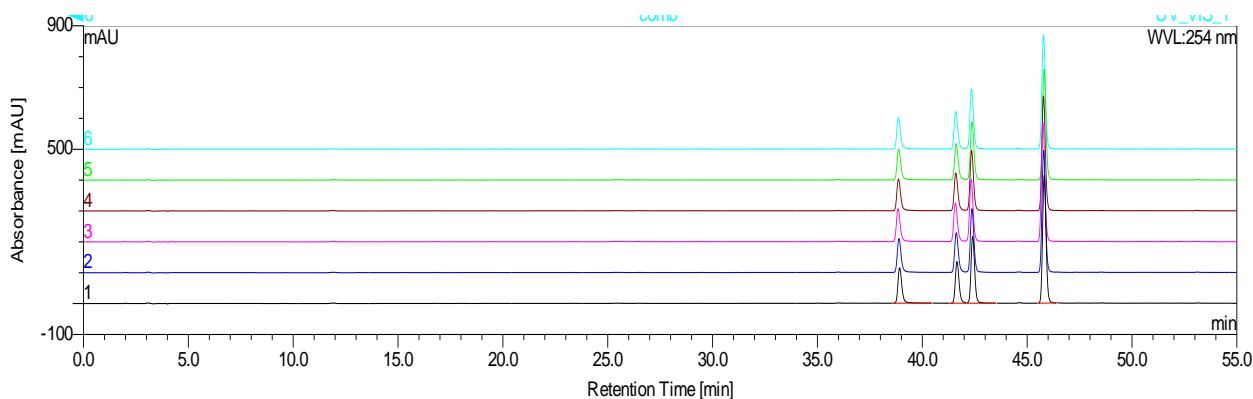
Біз алдымен 15 мг/мл *Climacoptera* текті өсімдіктің экстракт массасынан 5 рет жіберілген инъекцияның ЖЭСХ хроматограммасын аламыз. Нәтижесі 42-суретте көрсетілген. Ары қарай осы экстракт хроматограммасын салыстыру үшін таза стандартты ЖЭСХ хроматограммасына түсіреміз (43-сурет)



42 сурет - 5 рет жіберілген инъекцияның біріктірілген стандартты үлгілердің ЖЭСХ хроматограммасы, ондағы элюенттер: метанол/0,1% НСООН сулы ерітіндіде 8:92 - 78:22 (0- 50 мин), ағын жылдамдығы: 1 мл/мин; анықталуы: 254 нм

10 кесте - 20 мг/мл экстрактының нақты көрсеткіштері 5 рет жасалған инъекцияның негізінде анықталған

Инъекция/ №	Лютеолин		Кемпферол		Диосметин		Изорамнетин	
	Rt	Аудан	Rt	Аудан	Rt	Аудан	Rt	Аудан
1	38.75	34.67	41.58	40.90	42.54	56.63	45.76	156.62
2	38.76	35.12	41.62	41.48	42.37	57.93	45.80	162.15
3	38.75	35.44	41.58	40.35	42.54	59.09	45.81	158.60
4	38.78	36.28	41.60	41.62	42.35	57.36	45.78	158.65
5	38.81	36.01	41.64	41.75	42.58	56.46	45.79	159.19
Жалпы	193.85	177.52	208.02	206.10	211.88	287.47	228.94	759.21
Орташа	38.77	35.50	41.60	41.22	42.51	57.4	45.78	159.04
СА	0.02	0.76	0.02	0.80	0.01	1.72	0.02	4.15
ССА%	0.05	2.10	0.06	1.98	0.04	2.95	0.04	2.52



43 сурет - 6 рет жіберілген инъекцияның біріктірілген стандарты үлгілерінің ЖЭСХ хроматограммасы, ондағы элюенттер: метанол/0,1% НСООН сулы ерітіндіде 8:92 - 78:22 (0- 50 мин), ағын жылдамдығы: 1 мл/мин; анықталған: 254 нм.

Қондырғының жаңғыртылуы үлгі ерітіндісімен стандарты ерітіндісін бес және алты рет инъекция енгізу арқылы бағаланады 42-43 сурет. Изорамнетин, диосметин, кемпферол және лютеолин үшін ең тиімді ауыспалы бөлінуіне Sunfire суларымен, С18 4.6×250 мм, 5 мкм өлшемінде қол жеткізілді. Ұсталудың ССА шамасы мен шың ауданы 10-кестеде көрсетілген. ССА шамасының барлық мәндері 3%-дан төмен болды (N = 5). Алынған нәтижелер аталған хроматографиялық әдістің *C. subcrassa* текті өсімдіктің құрамындағы флавоноид кешеннің мөлшерін анықтауға мүмкіндік беретінін көрсетті. Жасалынған ЖЭСХ әдісі бойынша спиртті экстракт көмегімен жылдам анықтауға болатынын көрсетті. Әдісте қолданылған жағдайлар хроматограмма шындардың (40-сурет) жақсы бөлінуіне мүмкіндік берді: лютеолин Rt = 38,8 (54,3: 45,7, айн /айн), кемпферол Rt = 41,5 (58,1: 41,9 көлем / v), диосметин Rt = 42,3 (59,2: 40,8, айн/айн) және изорамнетин R = 45,8 (63,1: 36,9, айн/айн) ағын жылдамдығы 1 мл/мин болғанда.

Жоғарыда аталған АВ-8 макрокеуекті шайырдың көмегімен бөлінген биологиялық белсенді кешеннен таза флавоноидтың қоспасын және дара күйінде бөлінген затты А.К. Кипчакбаеваның ғылыми-зерттеу нәтижесінде көрсетілген.

Тақырыпты пысықтауға арналған сұрақтар:

1. Жоғарғы критикалық флюидті экстракцияның биологиялық белсенді заттарды бөлудегі жетістігі?
2. Жоғарғыкритикалық параметрлерін түсіндіріңіз?
3. CO₂ газының еріту кезіндегі температура мен қысымның әсері?
4. ЖК жағдайдағы негізгі ережелері қандай?
5. ЖЭСХ әдіс арқылы флавоноидтарды бөлудегі тиімді сорбенттер?

3. ФИТОПРЕПАРАТТАРДЫ БАҚЫЛАУ САПАСЫ ЖӘНЕ МЕМЛЕКЕТТІК ӨНДІРІС РЕГЛАМЕНТІ

Дәрілердің өнеркәсіптік өндірісі белгіленген тәртіп бойынша бекітілген, сәйкес нормативті техникалық құжатпен НТҚ регламенттеледі. НТҚ дәрілік препараттардың сапасы және әсерлігін жоғарылатуды қамтамасыз етуі керек, ғылым және техника жетістіктері негізінде үнемі жетілдірілуі керек және денсаулық сақтау, мемлекеттік қорғау, экспорт талаптарына сай дер кезінде ескірген көрсеткіштерді ауыстыру мақсатында қайта қаралады.

Нормативтік құжат — бұл әртүрлі қызметтер немесе олардың нәтижелеріне қатысты ережелер, жалпы принциптер немесе сипаттамалар бекітетін құжат.

Дәрілік зат, дәрілік өсімдік шикізаттары және медициналық техника бұйымдарына НТҚ келесі категорияларға бөлінеді:

- ✓ Технологиялық және техникалық регламенттер.
- ✓ Мемлекеттік фармакопея.
- ✓ Фармакопеялық мақалар.
- ✓ Уақытша фармакопеялық мақалар.
- ✓ Мемлекеттік стандарттар.
- ✓ Салалық стандарттар.
- ✓ Техникалық шарттар.
- ✓ Жетекші нормативті құжат — инструкциялық, әдістемелік нұсқаулар және т.б.
- ✓ Өндірістік және технологиялық инструкциялар.

Фармакопеялық мақала – дәріге, оның дайындалуына, сақтау жағдайы және сапасын бақылау әдістеріне талаптар бекітетін нормативті техникалық құжат. МФ медициналық қолдануға және өнеркәсіптік өндіруге Денсаулық сақтау министрлігі рұқсат еткен, сериялы өндірілетін дәрілік препарат немесе дәрілік өсімдік шикізатына бекітіледі.

Уақытша Фармакопеялық мақала — дәрілік препарат немесе дәрілік өсімдік шикізаты сапасына белгіленген талап және мемлекеттік стандарт сипатын сақтайтын, шектеулі мерзімге бекітілген нормативті техникалық құжат. Дәрілік препараттар және дәрілік өсімдік шикізатына УФМ Фармация комитетімен медициналық қолдануға ұсынылған және сериялы жаңа дәрілік препараттарға бекітіледі.

Стандарт — бұл әртүрлі қызметтер немесе олардың белгілі саладағы реттеудің оптималды дәрежесіне жетуге арналған нәтижелеріне қатысты жалпы және көп қайтара қолдануға бекітілген нормативті құжат.

Мемлекеттік және сапалық стандарттар — дәрілік препараттарды дайындауға және жеткізіп беруге қажетті қосымша техникалық талаптар және топтық сипаттамаларға тағайындалады. Кейбір шикізат, көмекші заттар, тара және орауыштар түрлері техникалық шарттармен немесе уақытша техникалық шарттармен нормаланады.

Технологиялық регламент — дәрілік заттарды дайындаудың технологиялық әдістері, техникалық құжаттар, нормалар және нормативті мазмұндалған нормативті құжат.

Техникалық регламент күші өндірістік бөлмелерді және персоналды жұмысқа дайындауды; өндірістің қажетті санитарлық гигиеналық жағдайын жасауды; еңбекті қорғау, техника қауіпсіздігі, қоршаған ортаны қорғау талаптарының орындалуын; НТҚ талаптарына сай дәрілік заттар алуды кепілдендіретін құрал жабдықтарды білікті, тиімді эксплуатациялауды қамтиды.

Өндірістік технологиялық регламент — өндіріс әдістерін, технологиялық нормативтерді, техникалық құралдарды, химиялық фармацевтік өнім шығаруда сапалық көрсеткіштері Фармакопейалық мақаланың талаптарына сәйкес дәрілік препараттар алуды қамтамсыз ететін технологиялық процестердің жүргізілу тәртібі мен шарттарын реттейтін, сонымен қатар, жұмыстарды жүргізу қауіпсіздігі мен өндірістің жеткілікті техникалық экономикалық көрсеткіштерге жетуін қамтамсыз ететін негізгі нормативті техникалық құжат.

Өнімнің өңделу сатысына, оны өндіру технологиясын меңгеру дәрежесіне немесе жүргізілетін жұмыстың мақсатына байланысты технологиялық регламенттер келесі түрлерге бөлінеді:



Лабораториялық регламент — жаңа өнім түрі өндірісінің технологиясын немесе сериялы шығарылатын өнімнің жаңа технологиялық тәсілін лаборатория жағдайында жасаудағы ғылыми жұмыстарды аяқтаумен бітетін технологиялық құжат.

Өндірістік — тәжірибелік регламент — оның негізінде жаңа өнім түрі өндірісінің технологиясын іске қосу және жаңа технологияны меңгеруде өндірістік тәжірибелік жұмыстарды жүргізу іске асырылатын технологиялық құжат.

Іске қосу регламент — оның негізінде жаңадан жасалынған өнім өндірісін меңгеру және эксплуатацияға енгізу жүргізілетін технологиялық құжат.

Өндірістік регламент — жұмыс істеп тұрған сериялы өнім шығарушы өндірістің технологиялық құжаты. Өндірістік регламент іске қосу регламенті негізінде оған өндірісті меңгеруде қабылданған өзгерістер мен толықтыруларды енгізген соң құрастырылады. Өндірістік регламент негізінде өнімнің сериялы шығарылуы меңгеріледі.

Типтік өндірістік регламент — өндірістің типтік технологиялық тәсілдерін, біртекті топ өнімдерін өндіру процесі үшін техникалық құралдарды, жұмыстарды жүргізу қауіпсіздігі мен алдыңғы қатарлы техникалық экономикалық көрсеткіштерді қамтамасыз ететін, нормалар мен нормативтерді бекітетін жетекші нормативті құжат.

Қазіргі таңда, ТМД мен басқа мемлекеттер сияқты, Қазақстанда да, дәрілік өсімдік шикізатының және фитопрепараттардың сапасын бақылау, негізінен, МФ XI басылымы және ГОСТ-тар бойынша, ал импортталған шикізаттың кіріс бақылауы фирмалар спецификациясы мен әлемнің жетекші мемлекеттерінің монографиялары, соның ішінде Еуропалық, Британдық және т.б. бойынша жүргізіледі. Халықаралық стандарттармен үйлестірілген дәрілік өсімдік шикізатының сапасын бақылау бойынша ҚР -да біртекті заңнамалық база құру ҚР Фармация Комитетінің алдындағы актуальді мәселенің бірі болып табылады. ҚР ВТО-ға ену концепциясы бойынша, халықаралық стандарттармен үйлестірілген дәрілік өсімдік шикізаттарының сапасын бақылау бойынша заңнамалық базаның базалық құжаты ретінде Еуропалық және Британдық Фармакопеяның сәйкес баптарын қолдану қажет деп есептейміз. Көрсетілген құжаттар халықаралық мәнге ие және жалпы мойындаған, ештеңе ойлап табудың қажеті жоқ, тек үйрене отырып, орындау қажет.



Онда өсімдік шикізатына жалпы сипаттама, оның негізіндегі дәрілік заттар, оның өндірісіне қойылатын талаптар, идентификациялау, тазалығы мен сандық талдау бойынша сынақтар жүргізу берілген.

Жоғарыда көрсетілгендей, ҚР-да басқа ТМД елдері сияқты, дәрілік өсімдік шикізаты мен оның негізінде алынған фитопрепараттар сапасын бақылау МФ ХІ басылымы және ГОСТ бойынша жүргізіледі. МФ ХІ басылымында «Дәрілік өсімдік шикізатын талдау әдістері» бөлімінде шикізат түрлері мен фармакогнозия әдістері келтіріледі. Екінші басылымында белгілі морфологиялық топтар: жапырақ, шөп, гүлдер, жемістер, тамырлар, тамырсабақтар, пиязшықтар және т.б. бойынша жіктелген жеке шикізат түріне 83 бап берілген. Әрбір топ үшін анықтама, жинаудың қарапайым мерзімдері, сыртқы белгілерінің ерекшеліктері, микроскопиялық, гистохимиялық сипаттамалары және сан көрсеткіштері берілген. Сынаманы дайындау және микроскопиялық сынамаларды жүргізу техникасы «Дәрілік өсімдік шикізатының микроскопиялық және микрохимиялық зерттеу техникасы» және «Люминесцентті микроскопия» баптарында берілген. Дәрілік өсімдік препараттарын сипаттайтын жалпы баптарға сипаттамасы, өндірісінің кейбір аспектілері мен сапа көрсеткіштерінің тізімі келтірілген «Жинақтар», «Эфир майлары», «Экстракттар» және т.б. баптар жатады.

Бүгінгі таңда дәрілік өсімдік шикізатына аналитикалық құжат айтарлықтай дамыған және келесідей сапа көрсеткіштерін қарастырады: дәрілік өсімдік шикізатының атауы латын, мемлекеттік және орыс тілдерінде көпше түрде, баптың преамбуласында дәрілік өсімдіктің және тұқымдасының атауы латын, орыс және мемлекеттік (қазақ) тілдерінде, бүтін немесе ұсақталған шикізатының түрі көрсетіледі. Преамбуладан кейін негіздігін (сыртқы белгілер, микроскопия, сапалық реакция) анықтайтын әдістерінің сипаттамасы берілген. «Сыртқы белгілер» бөлімінде диагностикалық белгілері (қабық, шөп, жапырақ және т.б.) сипатталады, мұнда өлшемдері,

түсі, дәмі және сулы оқшауының дәмі көрсетілуі тиіс. «Микроскопия» бөлімінде міндетті шарттар ретінде ұсақталған шикізат немесе ұнтақтың диагностикалық белгілерінің сипаттамасы беріледі. Құжатқа шикізаттың нағыздығын дәлелдейтін, арнайы белгілерді дәлелдеуге мүмкіндік беретін көрнекілік ретінде микропрепараттардың суреттері енгізіледі. Негіздігін анықтауда маңызды сапалық, гистохимиялық реакциялар берілетін «Сапалық реакциялар» бөлімі келтіріледі, бірақ сапалық химиялық реакциялар шикізаттың тазалығын нақты дәлелдей алмайды, ол тек шикізатта ББЗ белгілі тобының немесе қатарының, жиі шикізаттың осы түріне сәйкес емес ББЗ тобының барлығын көрсетеді. Тек стандартты үлгілерді қолдана отырып хроматографиялық талдау әдісі ғана шикізаттың таза екендігін жоғары сенімділікпен айтуға мүмкіндік береді. Дәрілік өсімдік шикізатына ғана тән «Сан көрсеткіштері» бөлімі, онда арнайы сапа көрсеткіштері беріледі: ұсақталғыштық, ылғалдылық, жалпы күл, 10% хлорлысутекте ерімейтін күл, сондай-ақ органикалық, минералды және басқа да қоспалар. Маңызды бөлімдердің бірі - «Сандық талдау», мұнда талдау әдістемесі толық сипатталады және осы шикізатта кездесетін биологиялық активті затқа есептегенде әсер етуші заттың құрам мөлшері анық нормаланады. Егер шикізаттан субстанция ретінде қолданылатын жеке зат бөлініп алынса, онда шикізатта осы заттың мөлшері есептеледі.

ДДСҰ ұсынған қауіпсіздіктің жаңа және өте маңызды сапа көрсеткіштері: микробиологиялық тазалық, пестицидтер, радионуклеидтер, ауыр металдар ізін анықтау. Қажеттілік кезде мынадай сапа көрсеткіштері енгізіледі: тығыздық, құрғақ қалдық, оптикалық айналу бұрышы, спиртті құрамы және т.б. Ерекше көңіл «Қаттау» және «Маркирлеу» бөлімдеріне бөлінеді, бұл бөлімдерде қаттамалар түрлері мен қаттама жапсырмасын графикалық безендіру сипатталады, сосын транспорттау және сақтау шарттары, физиологиялық активтілік типі беріледі.

Әлемнің жетекші мемлекеттерінің фармакопеяларының талаптарына сәйкес дәрілік шикізатқа заманауи халықаралық сапа стандарты көрсеткіштер мен әдістердің келесідей міндетті тізімін қамтуы керек:



Құрамында өсімдік текті материал мен химиялық идентифирленген белсенді заттары бар препараттар, химиялық құрылымы анықталған өсімдік текті компоненттері бар препараттар өсімдік текті препараттар болып есептелмейтіні әрқашан естен шығармауымыз керек.

ДДСҰ нақты нұсқауларына қарамай, өндіріс процесі мен өсімдік шикізатынан алынған дәрілік затты тіркеу кезінде туындаған сұрақтар әлі де шешімін тапқан жоқ. Ең алдымен, өсімдік текті дәрілік заттың тиімділігін объективті бағалау, сондай-ақ оларды ұзақ қолданудың қауіпсіздігі салдарынан. Бұл жағдай өсімдік шикізатынан алынған препараттарды клиникалық сынаудың қиындығы мен жоғары құндылығымен байланысты.

Дәрілік өсімдік шикізатының сапасын бағалаудың маңызды бағыты ДӨШ және одан алынатын фитопрепараттың құрамына енетін химиялық қосылыстардың биологиялық белсенді комплексін бағалау үшін биосенсорларды қолдану болып табылады. Морфологиялық құрамы бойынша бірдей дәрілік өсімдіктер өз қасиеттері бойынша ерекшеленетіні белгілі. Белгілі бір мөлшерде бұл олардың генетикалық аппаратының кейбір өзгерістері мен сәйкес гендердің экспрессия дәрежесімен байланысты. Өсімдік шикізатының белсенділігі мен қасиеттерін бағалау үшін молекулярлы маркерлер қолданылады, мысалы – нуклеин қышқылдары. Басқа маңызды мәселе – бұл дәрілік шикізатпен және фитопрепараттармен айналысатын дайындалған мамандардың аздығы, ғылыми базаның жоқтығы, фитохимия, өсімдік текті дәрілік заттарды стандарттайтын Институттың жоқтығы, стандартты үлгілерді табу қиындығы. Қазіргі таңда бұл сұрақтар ашық және шешілмеген күйі қалуда.

3.1 Фармацевтикалық технология туралы жалпы түсінік

Фармацевтикалық технология – дәрілік заттарды белгілі бір дәрілік пішінге келтіріп, дәрілік препараттарға дейін өңдеудің өндірістік процесі және теориялық негіздері жайлы ғылым.

Фармацевтикалық технология фармацевтикалық ғылымның негізгі бөлігі болып табылады, ал ол дәрілік заттардың және препараттардың өндірісі, қасиеттері, сонымен қатар фармацевтикалық қызметті ұйымдастыру және маркетинг туралы ғылым жүйесін құрайды.

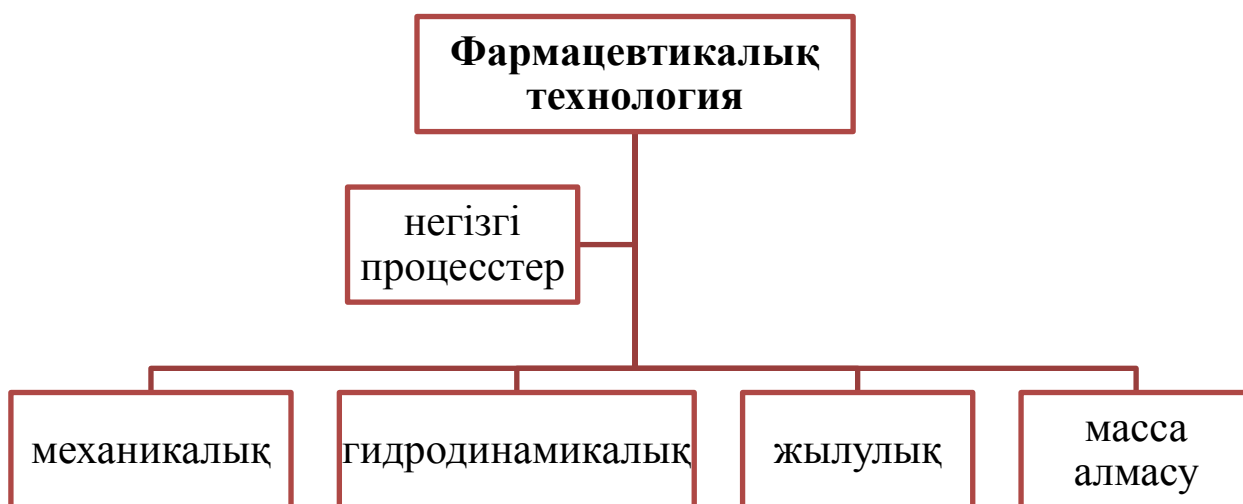
Тиімді дәрілік препаратты алу үшін дәрілік зат өңделуі керек, ал егер дәрілік зат өңделмесе, онда дәрілік затты қолдануға болмайды. Ол үшін рационалды дәрілік пішінді таңдау, спецификалық активтілігі жануарларда жүргізілген тәжірбиелерден тұратын емханаға дейінгі сынақтарды өткізу, биологиялық қол жетімдігін, биологиялық зиян еместігін, сонымен қатар сақтау кезінде тұрақтылығын зерттеу қажет.

Сонымен қатар бағытталған әрекеттегі дәрілік пішіндердің жаңа үлгісін енгізуін және қазіргі үлгісін жақсартуын, дәрілік пішіндердің барлық түрлерінің технологиясын жетілдіруін ескереді.

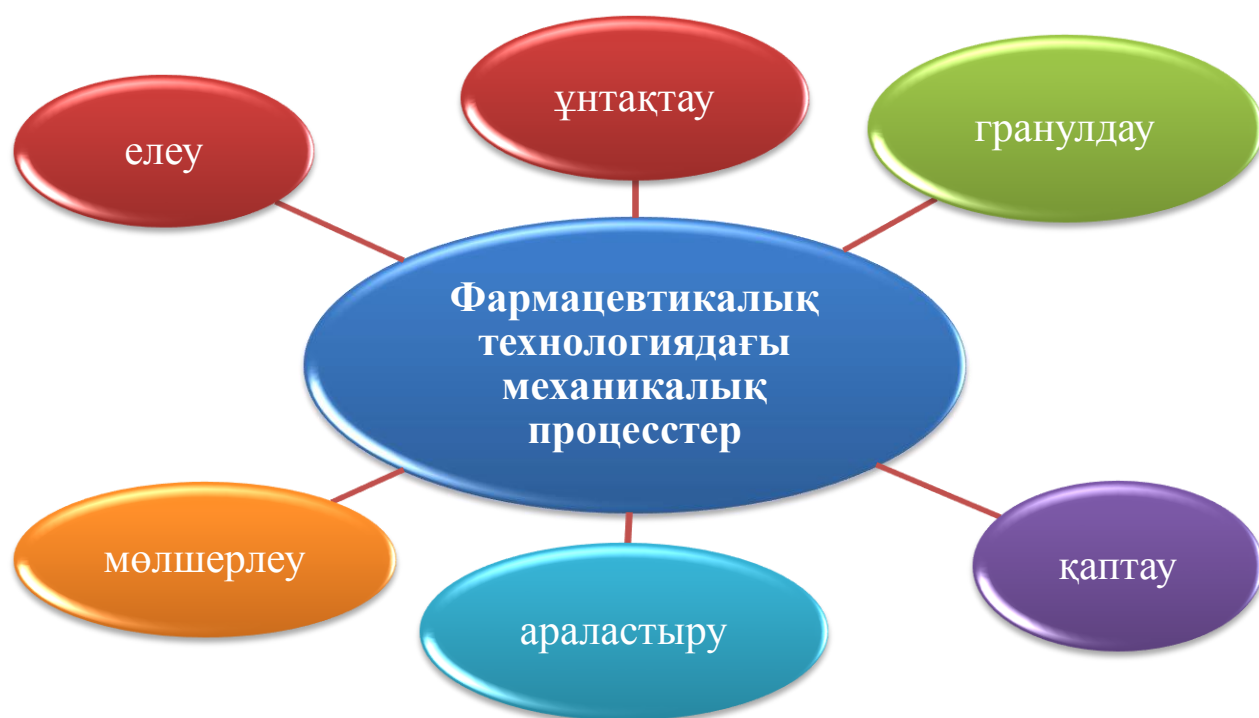
Дәрілік препараттарды жасаумен дәрілік пішіндердің технологиясы шұғылданады. Бұл ғылым басқа фармацевтикалық ғылымдардың (фармацевтикалық химия, фармакогнозия және т.б.) арасында ерекше орынға ие болады.

Фармацевтикалық технологияның негізгі міндеттері:

- жаңа дәрілік субстанциялар және препараттар өндірісінің әдістерін және де технологиялық негіздерін әзірлеу;
- қазіргі дәрілік препараттарды әбден жетілдіру;
- дәрі өндірісіндегі жаңа қосалқы заттарды іздеу, зерттеу және қолдану;
- дәрілік заттардың, препараттардың, жартылай дайындалған өнімдердің және басқа өнімдердің тұрақтылығын зерттеу және жарамдылық мерзімін белгілеу;
- технологиялық процестің тиімділігін зерттеу;



Фармацевтикалық технологиядағы механикалық процесстер мен аппараттар



Ұнтақтау. Бұл кезеңнің мақсаты - бөлшектердің мөлшерін кішірейтуі және олардың санының үлкейту арқылы біртекті ұнтақ қоспаны алу. Ұнтақталу кезінде өсімдік шикізатын ұнтақтау үшін дұрыс машина таңдалу қажет. Мыналарды ескеру керек:

- а) ұнтақталатын материал беріктілігі;
- б) өсімдіктердің морфология- анатомиялық ерекшеліктері және әрекет ететін заттар локализациясы;
- в) ұнтақталатын материалдың ылғалдылығы, шикізат 6-8% қалдықты ылғалдыққа дейін кептірілуі қажет.
- г) қажетті ұнтақталу дәрежесі

Ұлы немесе қатты тітіркендіретін шаңды түзетін дәрілік заттарды ұнтақтағанда аз шаңдалатын машиналарды, көбінесе шарлы диірмендерді қолданады. Ұнтақталуды жеке бөлмелерде жүргізеді.

Салқындаумен ұнтақталу. Сабынды, камидті, смоланы, қатты материалдарды ұнтақтатағанда салқындату нәзік заттарды жоғарлату үшін керек. Заттарды тоңазытқышта алдын ала салқындатудан кейін ұнтақталуды дезинтеграторда, салқын ауа жіберілетін ұсақталтын диірмендерде жүргізеді.

Көмекші заттар көмегімен ұнтақтау. Ұнтақталуды жүргізу үшін қиын ұнтақталатын заттарды ұнтақтау үшін оларға белгілі заттарды қосады. Сұйықтықтарды қосу арқылы камфора мен бор қышқылын ұнтақтайды.

Араластыру. Біркелкі араластыру күрделі ұнтақтарды дайындаудың негізгі мәселесі болып табылады. Араластырғышта, деинтеграторда, дисмембраторда оларды бірге араластыру қолайлы әдіс болып табылады. Көбінесе барабанды, кейде ленталы араластырғышты қолданады.

Елеу. Бір компоненттерді елеу елегіш механизмдерінде жүргізіледі. Күрделі ұнтақтарға келсек, онда елеу кезінде қоспаның біртектілігі

компонеттер қабатасуынан бұзылуы мүмкін, себебі соңғыларды жекелеп елегеннен кейін араластырады.

Мөлшерлеу және қаптау. Зауыттық жағдайларда мөлшерлеу мен қаптау бір уақытта және бір ағында жүргізіледі. Ұнтақтар үшін қаптамалы машиналар мөлшерлеу – көлем немесе масса принципі бойынша жұмыс істейді. Мөлшерлеудің көлемдік әдісінде тура дәлділікке жетуге келмейді, себебі дозатор кішкене қозғалса онда масса (ұнтақты тығыз қою салдарынан) өзгеруі мүмкін. Масса байынша мөлшерлеу автоматты таразыда қолданылады.

Гранулдау – бұл ұнтақ тәрізді материалдың белгілі өлшемді бөлшектерге (дәндерге) айналу процесі. Ажыратады: 1) ылғалды гранулдау (ұнтақты гранулдау процестің алдында немесе процесінде ылғалдандыру арқылы) және 2) құрғақ гранулдау.

Ылғалды гранулдау. Ылғалды гранулдау ылғалды массаны қысу (ысқылау) арқылы; өлшенген (псевдоқысылған) қабатта немесе шашыратқыш кептіру арқылы жүргізеді.

Қысу арқылы ылғалды гранулдау келесі кезекті операциялардан тұрады: дәрілік және қосалқы заттарды араластыру; ұнтақтарды гранулданған сұйықтықпен араластыру; ылғалды массаларды елеуіш арқылы ысқылау (қысу); кептіру және опалау.

Араластыру және ылғалдындыру операцияларды әдетте қиыстырады және араластырғышта орындайды. Ылғалды массаларды елеуіш арқылы ысқылауды грануляторлар (елеуіш машиналары) көмегімен жүргізеді.

Құрғақ гранулдау. Құрғақ (престеу) гранулдау – бұл берік гранулаларды алу үшін ұнтақтардың немесе олардың қоспаларының арнайы грануляторларда ылғалсыз тығыздалуы. Бұл әдіс дәрілік зат су әсерінен ыдыраған жағдайда қолданылады.

Құрғақ гранулдау:

1. Брикеттеу;
2. Балқыту немесе
3. Гранулану формалау (пресс-гранулдау) арқылы жүреді.

Кейбір аппараттарда гранулдау және кептіру операцияларын қиыстырады. Ылғалды күйде металды тормен контактыда бола алмайтын дәрілік заттар үшін де массаны ылғалдандыру, кептіру және ұсақтау қолданылады.

Гранулятты опалауды гранулану бетіне жұқаұсақталған заттарды (сырғанатын, майлайтын, қопсытқыш) бос жағу арқылы жүргізеді. Гранулятты опалауды әдетте араластырғыштарда жүргізеді.

Шашыратқыш кептіру арқылы гранулдау. Бұл әдіс ерітінді немесе сулы суспензия, қыздырылған ауа өтетін, форсункалары бар кептіргіш камерада шашыратылады. Шашырату кезде үлкен мөлшерлі тамшылар түзіледі. Тамшылар үлкен бет әсерінен ылғалды тез жоғалтады. Бұл кезде сфералық гранулалар түзіледі. Бұл әдіс термолабильді заттар үшін қолданылады, себебі бұл жағдайда ыстық ауасы бар контакт минималды болады.

3.2 Фармацевтикалық технологиядағы гидродинамикалық процесстер мен аппараттар

1	2	3
<ul style="list-style-type: none">• дәрілік заттарды еріту	<ul style="list-style-type: none">• гетерогенді жүйелерді бөлу	<ul style="list-style-type: none">• гетерогенді және гомогенді жүйелерді алу

Фармацевтикалық технологияда *еріту* мақсатында қолданылатын араластырғыштар аппараттар:

- Қалақты;
- Пропеллерлі;
- Турбиналық;
- Акустикалық.

Фармацевтикалық технологияда *гетерогенді жүйелерді бөлу* үшін келесі аппараттар қолданылады:

- Фильтрлер;
- Центрифугалар:
 - фильтрлеуші;
 - тұндырғыш.
- Сеператорлар.



Гетерогенді және гомогенді жүйелерді алу үшін араластыру қолданылады:

- ✓ Механикалық;
- ✓ Пневматикалық;
- ✓ Гравитационды.

Фармацевтикалық технологиядағы жылулық процесстер мен аппараттар



Фармацевтикада **буландыру** мақсатында негізінен вакуумдық аппараттар қолданылады:

- шарлы;
- құбырлы;
- еркін айналымды, табиғи айналымды, мәжбүрлі айналымды;
- пленкалы;
- роторлы.



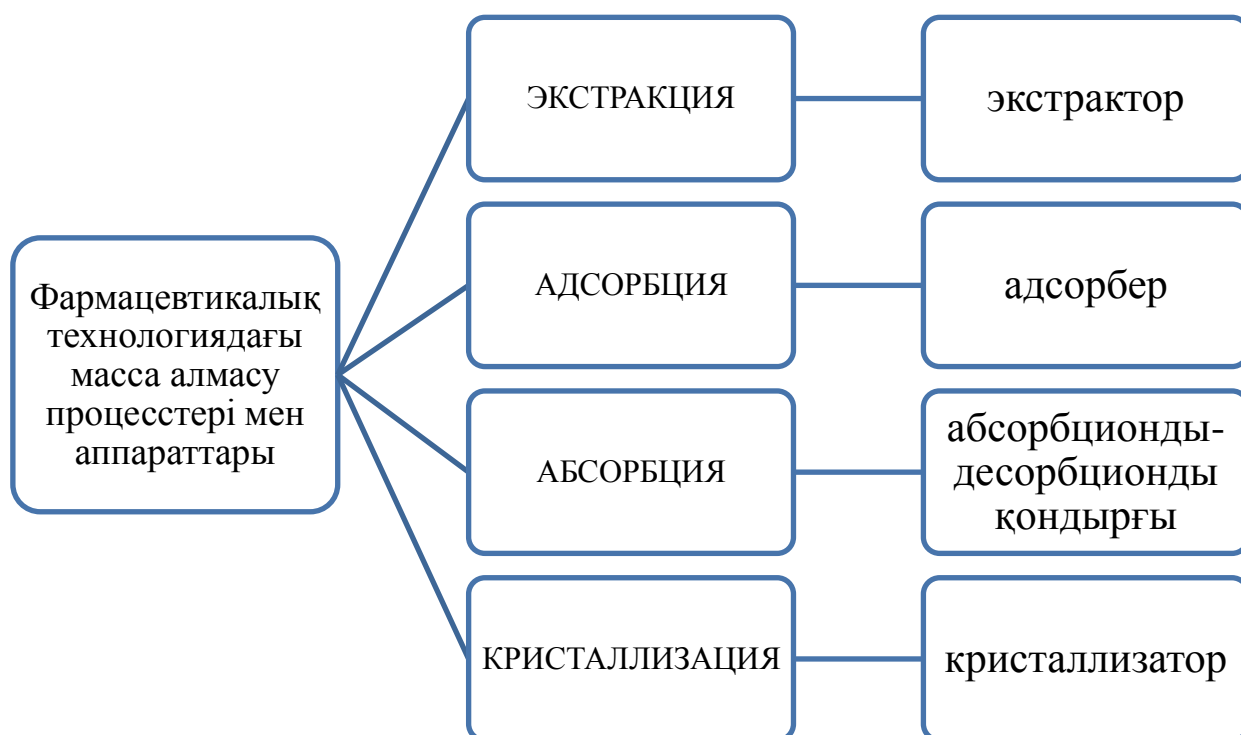
Фармацевтикалық технологияда қолданылатын беттік жылу алмастырғыштар:

- ✓ жылан тәріздес,
- ✓ пластинкалы,
- ✓ спиральды т.б.

Фармацевтикалық технологияда қолданылатын контактілі жылу алмастырғыштар:

- ✓ араластыру конденсаторлары,
- ✓ бу және газ барботажы бар аппараттар т.б.

Фармацевтикалық технологиядағы масса алмасу процесстері мен аппараттары



Фармацевтикалық технологиядағы қоланылатын *экстракторлар*:

- Дифференциалды-контактілі экстракторлар:
 - Тозандатқыш;
 - Тарелкалы;
 - Роторлы;
 - Пульсационды;
 - Орталықтан тепкіш.
- Араластырғаш-тұндырғыш экстракторлар.



Фармацевтикалық технологиядағы қоланылатын *кристаллизаторлар*:

- ❖ беттік;
- ❖ көлемдік.

Қорытындылай келгенде, фармацевтикалық технология фармацевтикалық ғылымның негізгі бөлігі болып табылады, ал ол дәрілік заттардың және препараттардың өндірісі, қасиеттері, сонымен қатар фармацевтикалық қызметті ұйымдастыру және маркетинг туралы ғылым жүйесін құрайды.

Тақырыпты пысықтауға арналған сұрақтар:

1. Фитопрепараттардың құрамындағы ББЗ жайлы негізгі түсінік, олардың қасиеттері?
2. Медициналық фитопрепаратты әзірлеудегі негізгі Қазақстан Республикасының Мемлекеттік фармакопеясының құрлымын бағалаңыз?
3. Фармацевтикалық технологияның заманауи жағдайы мен даму перспективалары жайлы түсінік беріңіз?
4. Фармацевтикалық технология ғылым ретінде және оның заманауи міндеттері. Фитопрепарат технологиясы мен биомедициналық технология дамуының негізгі этаптары қандай?
5. Медициналық фитопрепараттарды саралау жоспарын дайындау мен сапасын бақылау түрлеріне түсініктеме беріңіз?

3.3 Стандарттау және сапаны бақылау.

Кездейсоқтықты болдырмау мақсатында дәрілік заттарды шығаратын өнеркәсіп мекемелерде өндіріс үдерісі анықталған нақты нұсқаулықтармен қарастырылған стандартты жағдайларда жүргізіледі. Барлығы бір жинақты құжатқа біріккен – реттеме. Өндірістің технологиялық реттемесі (лат. тәртіпке салу, реттеу) – бұл өндіріс әдістерін, технологиялық нормативтерді, техникалық амалдарды, химико-фармацевтикалық өнімдерді өндірудегі технологиялық үрдістерді жүргізу жағдайлары мен реттерін, сапа көрсеткіштері фармакопоялық құжат талаптарына сәйкес келетін дәрілік затты алуды қамтамасыз ететін орнатушы нормативті құжат. Сонымен қатар қауіпсіз жұмыс жүргізуді және нақты өнеркәсіптің оптималды технико-экономикалық көрсеткіштерге жетуді орнататын құжат. Дәрілік заттың өндіріс реттемесін негізгі технологиялық құжат ретінде келесі жағдайларда қолданылады: әзірлеу және өндіріске жаңа дәрілік заттарды енгізу үрдістерінде технологияны өңдеу кезінде; қауіпсіздік техникасы, өнеркәсіптік санитария және өртке қарсы шаралар бойынша өндірістік нұсқаулық құрастыру кезінде; өндірістік қалдықтарды жою, өндірістік ағынды суларды және атмосфераға шығарылатын ластануларды залалсыздандыру және тазалау бойынша іс-шараларды құрастыру және жүзеге асыру кезінде; технико-экономикалық нормативтерді, сонымен қатар шикізаттар мен материалдардың шығындалу нормасын орнату кезінде; өнеркәсіптік өндірісті жобалау үшін бастапқы деректерді дайындау кезінде. Технологиялық регламенттер келесі санаттарға бөлінеді: зертханалық, тәжірибелік-өнеркәсіптік, іске қосу (уақытша), өнеркәсіптік және типтік.

Зертханалық реттеме - жаңа дәрілік заттарды өндіру кезінде зертханалық жағдайда ғылыми зерттеулерді аяқтайтын технологиялық құжат. Ол жаңа дәрілік заттардың технологияларын әзірлеуге және клиникалық сынақтарға арналған жаңа зат құруға арналған тәжірибелі-өнеркәсіптік қондырғыларды жобалау мен пайдалануда қолданылады. Тәжірибелі-өнеркәсіптік реттеме - эксперименталдық өндірістік объектіде дәрілік препараттың жаңа технологиясын әзірлеуді аяқтайтын технологиялық құжат. Ол өндіріс пен тестілеу үшін, жартылай өндірістегі жаңа дәрі-дәрмектердің үлгілерін, нормативтік құжаттарға енгізілген жаңа дәрілік препараттардың сапалық көрсеткіштерін, мысалы, уақытша фармакопоялық құжаттарды сынақтан өткізу үшін және жаңа өнімдердің өнеркәсіптік өндірісін жобалауға деректер жинау үшін қолданылады. Бастапқы (уақытша) реттеме – бұл технологиялық құжат болып табылады, оның негізінде дәрілік препараттың жаңадан шығарылған өнеркәсіптік өнімін пайдалануға енгізу мен дәрілік заттың жаңадан құрылған өнеркәсіптік өнімін игеру. Оны тәжірибелі-өнеркәсіптік реттеме және осы өнімді өндіруге жобалау құжаттары негізінде құрады, сондай-ақ нақты қолданыстағы өндіріс негізінде жүзеге асырылады.

Өнеркәсіптік реттемелер дәрілік заттың ағымдағы сериялық өндірісінің технологиялық құжаты болып табылады. Өндірісті дамыту кезінде қабылданған өзгерістер мен толықтырулар енгізілгеннен кейін іске

қосу рәсімінің негізінде жасалады. Типті реттеме - бұл өндірістің стандартты технологиялық әдістерін, нормалар мен нормативтерін, өнімнің біртекті топтарын өндіру үрдістері үшін техникалық тәсілдерді орнататын басқарушы нормативті құжат, мысалы, таблеткалар, капсулалар, инъекциялық ерітінділер және т.б. Типтік реттемелер үлгілік реттеме әзірленген біртекті өнімдер санынан нақты дәрілік препаратты өндіру үшін барлық санаттағы технологиялық реттемелерді дайындауға бағытталады. Сериялық өндіріс тек өндірістік нормалар негізінде жүзеге асырылады. Технологиялық реттемелердің барлық талаптарын сақтау міндетті болып табылады. Қолданыстағы технологиялық реттемелерді бұзғаны үшін кінәлі адамдар Ресей Федерациясының қолданыстағы заңнамасына сәйкес осы бұзушылықтың салдары басқа жазаны қолдануды талап етпесе, қатаң тәртіптік жауапкершілікке тартылады. Осылайша, біздің елімізде дәрілік заттарды жасау және өндіру қатаң стандартталған, бұл халықты дәрі-дәрмекпен қамтамасыз етудің жоғары деңгейін қамтамасыз етеді. Барлық нормативтік құжаттар фармацевтика мен ғылымның жетістіктеріне, сондай-ақ денсаулық сақтауға қатысты қабылданған федералдық заңдарға сәйкес жаңартылады.

3.4 GSP ережелері - Good Storage Practice

Дәрілік заттардың сапасына сенімді кепілдік беруге болады, егер өндіріс циклінің барлық кезеңдерінде барлық ережелері қатаң сақталса, атап айтқанда, алдын-ала клиникалық және клиникалық зерттеулерде, өндірісте, фармацевтикалық өнімдерді көтерме және бөлшек сатуда. GLP, GCP, GMP, GDP, GPP - халықаралық талаптар аса маңызды рөл атқарады. фармацевтикалық сектордың қызметкерлерінің қызметінде ерекше мәнге ие GSP талаптары - дәрілік заттарды сәйкес сақтау тәжірибесі. Қазіргі уақытта осы сапа стандартын зерттеу және сақтау фармацевтикалық бизнестің өте өзекті міндеті болып табылады. Фармацевтикалық материалдарды және өнімдерді сақтау және тасымалдау олардың айналымының барлық кезеңдерінде жүреді және осы операцияларға фармацевтикалық нарықтың барлық қатысушылары қатысады. Сондықтан GSP стандарттарына сәйкес келетін дәрілік заттарды сақтау үшін ұлттық немесе ең болмағанда ішкі компания стандарттарын жасамай, оны тәжірибеде сақтамай, дәрілік заттардың сапасы, қауіпсіздігі және тиімділігі туралы сеніммен айту мүмкін емес.

Сарапшылардың пікірі бойынша фармацевтикалық нарық қатысушылары ішкі GDP стандартын әзірлеу және қабылдау көтерме сауда буынының жұмысының сапасын арттыруда оң рөл атқаруы мүмкін. GDP -нің негізгі қағидалары - Жақсы тарату тәжірибесі (фармацевтикалық өнімдерде көтерме сауданың тиісті деңгейіне қатысты ережелер) келесі ережелер болып табылады. Индустриалды дамыған елдерде фармацевтика өнеркәсібі GMP талаптарына сай келетін дәрі-дәрмектердің жоғары сапасына кепілдік береді.

Еуропалық Одақ елдерінде АҚШ, Канада, Жапония және басқа да бірқатар фармацевтикалық өнімдер егер ол белгілі бір талаптарға сәйкес жүзеге асырылса ғана сатуға жіберіледі. Бұл саясат сатуға шығарылған өнімдердің тиісті сапаға ие болуын қамтамасыз етеді. Фармацевтикалық препараттарды жоғары сапалы деңгейде сақтау керек, өйткені сатуға рұқсат етілген дәрілік заттар олардың қасиеттерін өзгертпей көтерме және бөлшек сатылады. Фармацевтика өнеркәсібінде сапаны басқару тұжырымдамасы GMP нұсқаулығында сипатталған және мүмкіндігінше дәрілік заттарды сатуда қолданылуы керек. Бұдан басқа, фармацевтикалық өнімдердің сапасын және көтерме саудагерлердің қызмет көрсету деңгейін ұстап тұру үшін олар GDP қағидалары мен ережелерін қолдануы керек. Дәрілік заттардың дистрибьюторларымен (көтерме саудагерлерімен) қолданылатын сапа жүйесі заңнамаға сәйкес пайдалануға рұқсат етілген дәрілік заттардың сақталуын қамтамасыз етуі керек, барлық сақтау шарттары әрдайым құрметтеледі, соның ішінде тасымалдау кезіндегі ластану мен ластаудың алдын алу жөніндегі шаралар қабылданады, фармацевтикалық өнімдер қорының барабар айналуы бар және өнім қауіпсіз және сенімді сақтау орындарында сақталады. Нашар өнімдерді қайтару жүйесі және есірткіге қарсы тиімді схема болуы керек. GDP ережелері қызметкерлерге қойылатын талаптарды белгілейді, құжаттарды ресімдейді (тапсырыстар, мәмілелер, есептер), үй-жайлар мен жабдықтар, клиенттерге жеткізілімдер, өнімдерді қайтару (сенімді және ақаулы), өзін-өзі тексеру және т.б. Сақтау және тасымалдау шарттары GSP стандартында толығырақ сипатталады, онда фармацевтикалық өнімнің бастапқы сатысында өндірістен тұтынушыға дейінгі бастапқы сапасының сақталуын қамтамасыз ететін нақты талаптар бар.

Фармацевтикалық препараттарға арналған жақсы сақтау тәжірибесі туралы нұсқаулық мамандарға фармацевтикалық өнімдерді сақтау, тасымалдау және тарату үшін негізгі талаптар жиынтығын ұсынады. Ол ДДҰ басшылығымен өзара байланысты: Good trade and distribution practice (GTDP) of pharmaceutical starting materials (сауда ұйымдастыру және бастапқы фармацевтикалық материалдарды тарату ережелері)⁵; The stability testing of pharmaceutical products containing well-established drug substances in conventional dosage forms (information given in connection with regulation for marketing authorization) (әйгілі дәрілік заттар бар әдеттегі дәрілік формалардағы фармацевтикалық өнімдердің тұрақтылығын тексеру (есірткіні тіркеуге байланысты ақпарат); Good manufacturing practices (GMP); The cold chain, especially for vaccines and biologicals (суық тізбегі, әсіресе вакциналар мен басқа биологиялық өнімдер үшін); The International Pharmacopoeia (халықаралық фармакопея). GSP осы құжаттарды фармацевтикалық өнімдерді сақтау және тасымалдау үшін арнайы шаралар сипаттамасымен толықтырады. Бұл ережелер ұйымның жеке қажеттіліктеріне бейімделуі мүмкін, ол сапа талаптарының мәнін өзгертпестен қарастырылады. Оны пайдаланудың жарамдылығын қамтамасыз ету үшін материалдарды қайта қарау қажет болғанда, сапаны сақтау тұрғысынан қайта сынау күні маңызды болып табылады. Ресейде

қайта тексерілетін күн - қайта өңдеу күні, қаптамада көрсетілген, фармакопегияның немесе басқа ерекшеліктің талаптарына сәйкестігін тексерместен дәрі-дәрмектерді өндіру үшін шикізат ретінде пайдаланылуы мүмкін дәрілік заттардың дұрыс қолданылуы және сақтауы мүмкін. Осы уақыттан кейін, субстанцияны қажетті мақсатта пайдалануға болады, егер спецификацияға сәйкестігі үшін толық талдау (тест) нәтижесі бойынша оң нәтиже алса ғана. Бұл жағдайда жаңа қайта санау мерзімі белгіленеді.

Құжаттың маңызды бөлігі фармацевтикалық ұйым қызметкерлерінің негізгі талаптары болып табылады және қызметкерлердің жеке сипаттамаларына дейін сандық және сапалық аспектілерге қатысты. Осылайша, фармацевтикалық өнімдерді сақтаудың сапалы және қауіпсіздігіне қол жеткізу үшін әрбір сақтау орнында (өндіруші, дистрибьютор, көтерме, фармация немесе денсаулық сақтау мекемесі) білікті қызметкерлердің (ұлттық заңнамаға сәйкес) жеткілікті саны болуы керек. Барлық қызметкерлер GSP Ережелерінде тиісті оқытудан өтуі керек, тиісті нұсқауларға, рәсімдерге және қауіпсіздік шараларына бағынады. Ұйымның барлық қызметкерлері жеке гигиена мен санитарияның жоғары деңгейін сақтауы керек. Сақтау орындарында жұмыс істейтін қызметкерлер өздері жүзеге асыратын қызмет түріне сәйкес келетін тиісті қорғаныш киімді киюі керек. Қажет болса, сынамаларды іріктеу нұсқауларына сәйкес қатаң сәйкес дайындалған және білікті қызметкерлер қабылдайды. Үлгілер таңдалатын пакеттер тиісінше таңбалануы керек. Таңдаудан кейін өнім оқшаулануға тиіс. Лотты оқшаулау карантин және кейінгі сақтау кезінде сақталуы тиіс. Материалдар мен фармацевтикалық өнімдер рұқсат етілген растау немесе ауытқу алынғанша карантинге қалуы тиіс. Қабылданбаған материалдар мен фармацевтикалық өнімдерді пайдалану мүмкін еместігіне көз жеткізу керек шаралар. Олар қалған материалдар мен бұйымдардан күтпеген жоюға немесе жеткізушіге қайтарғанға дейін ұсталуы керек. **GxP жүйесі**

11 кесте – сапаны бақылау



Бүгінгі күні фармацевтикалық өндірісті дамытуда көп бағытты үрдістермен сипатталып, ең алдымен көптеген «ескірген» кәсіпорындардың

бәсекеге қабілеттілігінің төмендеуі байқалады. «Сапа» және «қауіпсіздік» сияқты ұғымдар фармацевтикалық өнеркәсіптің барлық кәсіпорындарының ұраны болуы тиіс. Қазіргі заманғы әлемдік фармацевтика нарығы қарқынды дамып келеді, бұл бәсекелестіктің артуына және кәсіпорындарды басқаруды ұйымдастырудың жаңа талаптарына алып келеді. Әлемдегі алдыңғы қатарлы елдердегі осы сектордағы кәсіпорындардың талдауы нәтижелері менеджменттің стратегиялық мақсаттарына қол жеткізу ISO 9001, GMP, GLP, GCP, ЖІӨ және т.б. сәйкес сапаны басқарудың еуропалық әдістерін және басқару жүйелерін сертификаттау арқылы қамтамасыз етілгенін көрсетеді.

Дәрілік заттардың сапасын қамтамасыз ету жүйесі:

- Өнім барлық талаптарға және стандарттарға сәйкес келеді;
- Өндіріс пен бақылау бойынша барлық операциялар стандартты ережелерге сәйкес айқын түрде ресімделеді;
- жауапкершілік пен өкілеттілік қатаң анықталған;
- шикізат пен буып-түю материалын өндіру, жеткізу және пайдалану бойынша шаралар қабылданады;
- Аралық өнімдер мен технологиялық процестерді бақылау, сондай-ақ валидация;
- дайын өнімді бақылау және тексеру стандарттар мен заңнаманың талаптарына сәйкес жүзеге асырылады;
- сапаны қамтамасыз ету жүйесінің тиімділігі мен жарамдылығын үнемі бағалайтын өздігінен тексеру және / немесе сапаны тексеру рәсімі жүргізіледі.

GMP (*Good Manufacturing Practice, Жақсы өндірістік тәжірибе*) - адамдарға және жануарларға арналған дәрілік заттарды өндіру мен сапасын бақылауға қойылатын талаптарды, сондай-ақ белсенді фармацевтикалық заттар мен дәрілік заттардың белгілі бір түрлерін өндіруге қойылатын арнайы талаптар. GMP стандарттары өндірістік көрсеткіштер мен зертханалық тестілеуді реттейді және бағалайды.

GLP (*Good Laboratory Practice, Жақсы зертханалық практика*) - ұйымдық үдерісті және денсаулық пен экологиялық қауіпсіздікпен байланысты дәрілік заттарды клиникалық емес зерттеулерді жүргізетін сапалық жүйе.

GCP (*Good Clinical Practice, Жақсы клиникалық практика*) - адами тақырыпты зерттеуді жоспарлау және жүргізу үшін халықаралық этикалық және ғылыми стандарт, сондай-ақ осындай зерттеулер нәтижелерін құжаттау және ұсыну.

GSP (*Good Service Practice, Қызметтің жақсы тәжірибесі, сақтау*) - фармацевтикалық өнімдерді дұрыс сақтау мен тасымалдауды қамтамасыз етуге бағытталған шаралар кешенін белгілейді.

GDP (*Good Distribution Practice, Көтерме сауданың жақсы практикасы*) - дәрілік заттарды сақтау сапасын қамтамасыз етуге бағытталған ережелер жүйесі.

GPP (*Good Participatory Practice, Жақсы бөлшек сауда*) дәріхана қызметкерлерінің халыққа ұсынатын фармацевтикалық қызметтердің тиісті сапасын қамтамасыз етуге бағытталған ережелер мен ережелер жиынтығы.

GxP басқару жүйесін енгізу артықшылықтары:

- дәрілік заттардың сапасы мен қауіпсіздігін қамтамасыз ету тәсілін өзгерту, бұл ақауларды жою және тауардың қайтарылуынан шығынды азайтады;
- дәрі-дәрмектердің қауіпсіздігін қамтамасыз ету бойынша жауапкершіліктің нақты анықтамасы;
- дәрі-дәрмектердің қауіпсіздігіне деген сенімнің құжатталған растауы, бұл тұтынушымен жұмыс істеу кезінде ерекше маңызды, сонымен қатар сот процестерінде;
- шикізаттан тұтынушыға дейін есірткінің қауіпсіздігінің барлық параметрлерін қамтитын жүйелі тәсілдерді қамтамасыз ету;
- қауіпсіздікті басқару үшін ресурстарды үнемді пайдалану;
- стандартты емес өнімдерді шығарумен байланысты қаржылық шығындарды азайту;
- өндірілетін дәрі-дәрмектердің сапасына тұтынушылардың сенімін арттыру;
- тұтастай алғанда кәсіпорынның жұмысын қамтамасыз ету және, атап айтқанда, басқару және бақылау жүйелерінің оңтайлы жұмыс режимі;
- жаңа нарықтарға шығу және бар мүмкіндіктерді кеңейту;
- ЕО елдеріне көптеген дәрілік заттарды экспорттау мүмкіндігі;
- шетел инвесторларының инвестицияларға дайындығын арттырды;
- сапалы және қауіпсіз дәрілік заттарды өндіруші беделін қамтамасыз ету.

3.5 Дәрілерді өндірудегі валидациялық процестер

Фармацевтика өнеркәсібінде арнайы процестің анықтамасы «технологиялық үдеріс» арқылы толық қамтылған, яғни, дәрілік препаратты өндіру процесі. Әрине, препарат сапалы деп болжанады. «Препараттың сапасы» дегеніміз не? Ең алдымен, бұл оның эффективтілігі, қауіпсіздігі және техникалық сипаттамаға сәйкестігі (сапа стандарты). Техникалық сипаттамаға сәйкестік сапаны бақылаумен расталады (шын мәнінде, тексеру), бірақ мәселе - бақылаудың таңдаулы болуы. Яғни бақылаудың нәтижелері сатуға шықпайтын сынақ үлгілерінің негізінде бүкіл серияға қолданылады. Бұл үлгі өкілеттігін дәлелдеу әлі де үлкен міндет. Әрі қарай бұдан да жаман. Препараттың қауіпсіздігі мен тиімділігі оны қолдану процесінде ғана расталады (немесе расталмайды) яғни еш нәрсені өзгерту, түзету мүмкін емес.

Сондықтан GMP (Good Manufacturing Practice) негізгі қағидаларының бірі технологиялық процестің валидациясы. Процестің валидациясы - бұл жеке өтінім - 1987 жылы GMP құрамына кірген GMP-ның 15-қосымшасы. Валидтеу нәтижесі болмаса, дәрілік препараттың коммерциялық өндірісі мүмкін емес, қатаң айтылса - тыйым салынады. Валидация GMP

концепциясын қолдайды, яғни түскен салмақты дайын өнімнің сапасын бақылаудан процесінің сапасын қамтамасыз етуге өткізеді. Сонымен қатар, валидацияны ұйымдастыру және өткізу рәсімдері GMP негізгі қағидаттарын көрсетеді, атап айтқанда: дұрыс жоспарлау, нақты іске асыру және толық құжаттама. Тексеру сапасы мен өзгерістерді басқару үшін тәуекелдерді бағалауға негізделген ғылыми тәсіл ретінде GMP үшін маңызды элементтерді қамтиды.

Валидация дегеніміз не?

«Валид» түбірі жарамды деген мағынаны білдіреді. Орыс тілінде осы түбірмен бірнеше сөз бар, мысалы, «инвалид» - жарамсыз, «валид» - жарамды. Фармацевтика өнеркәсібінде «валидация» термині келесідей түсіндіріледі:

- *Өндірістік процесс,*
- *Аналитикалық әдістер,*
- *Қолданылатын жабдықтар,*
- *Өндіріс жүйелері*

қолданыстағы GMP қағидаттарына сәйкес келетіндігі және олардың функционалды мақсатын яғни, оларды пайдалану күтілетін нәтижелер беруін орындауы туралы дәлелденген сенімділік деңгейге қол жеткізуді растайтын құжатталған үдеріс.

Шын мәнінде, технологиялық үдерісті дәлелдеу түпкілікті мақсат болып табылады, ол үшін бірқатар басқа да тиісті процестерді дәйекті түрде тексеру қажет. GMP-де «валидация» жалпы термині «процестерді валидациялау» және «өндірістік жүйелердің біліктілігі» деген екі ұғымға бөлінеді. Өндірістік жүйелердің біліктілігі – жабдықтарды, инженерлік жүйелерді, дәрі-дәрмектер өндірісінде қолданылатын үй-жайлардың үйлесімділігін құжаттауға бағытталған валидация процесінің бір бөлігі болып табылады. Біліктілік өндірістік жүйенің өнім сапасына әсерін тигізбеуін қамтамасыз ету үшін, сондай-ақ егер процесті тексеру кезінде теріс нәтиже алсақ, бұл жабдықтың, жүйелердің және жүйелердің сәтсіздіктеріне байланысты болмауы үшін жүргізіледі. Ал себептерді технологиялық процестің өзінде іздеу қажет. Оның логикасы бойынша өндіріс жүйелерінің біліктілігі белгілі бір алдын алу шарасы болып табылады.



Схема - процесі тексерудің үш кезеңі

Осылайша, фармацевтика өнеркәсібінде процесі валидациялауға мыналар кіреді:

- Таза бөлмелердің біліктілігі
- Инженерлік жүйелердің біліктілігі (таза ауаны, тазартылған суды және инъекцияға арналған суды, сығылған ауаны және т.б. дайындау)
- Өндірістік жабдықтың біліктілігі
- Сараптама жабдығының біліктілігі (шикізат, жартылай фабрикаттар және дайын өнім сапасын бақылау үшін пайдаланылады)
- Сақтау орындарының (шикізат, дайын өнім) біліктілігі
- Компьютерлендірілген жүйелерді, соның ішінде АТ инфрақұрылымының біліктілігін растау
- Талдау әдістемелерін тексеру
- Фармакопея әдістерін тексеру (ұлттық немесе аймақтық фармакопеяға енгізілген әдістер)
- Үй-жайларды, жабдықтарды тазалауды растау
- Асептикалық жағдайды растау
- Технологиялық процесің кезеңдерін растау
- Қаптаманың растауы

Валидациялық жұмыстарды ұйымдастыру

Валидациялық жұмыстарды орындау үшін жауапкершілік, әдетте, сапаны қамтамасыз ету департаментіне жүктеледі. Құрылымдық бөлімшелердің қызметін үйлестіру үшін Тексеру комиссиясы мен валидациялық топтар құрылады.

Құжаттамалық қолдау

Валидтеу құжаттарының стандартты пакеті:

- Валидация шебер-жоспары (немесе Валидацияның Бас жоспары)

— Валидация құжаттары (әрбір объект үшін бөлек): Пайдаланушы талаптарының ерекшелігі (URS, Пайдаланушы талаптары); Тәуекелдерді бағалау хаттамасы; Валидациялық жұмыстардың бағдарламасы (сценарий); Хаттама / валидация жұмысының есебі; Бағдарлама (жоспарланған, жоспарланбаған) қайта растау (қайта тексеру)

Біліктілік

Әрбір критикалық инфрақұрылым объектісі үшін, әдетте, төрт қатарлы кезеңде жүзеге асырылатын біліктілік қажет:

- Жобаның біліктілігі (**DQ**, **Design Qualification**)
- Орнату біліктілігі (**IQ**, **Installation Qualification**)
- Қызметінің біліктілігі (**OQ**, **Operational Qualification**)
- Қолданыстағы біліктілік (**PQ**, **Performance Qualification**)

Жобаның біліктілігі (DQ) техникалық құралдардың, инженерлік жүйелер мен жабдықтардың мақсатты пайдалану үшін жобаның (дизайн, жобалау шешімі) жарамдылығын құжатталған растауға бағытталған. Осы кезеңдегі жұмыс көлемі:

- Жүйенің сипаттамасы (функциясы, жабдықтың параметрлері, арнайы сипаттамалары)
- Техникалық құжаттама (нормативтік талаптар, жабдықтар құжаттамасы)
- Құрылымды бағалау (құрылымдық материалдар, ластану қаупін бағалау)
- Жабдықтардың / жүйелердің компоненттері / элементтері
- Ықтимал қателер / ақаулықтарды талдау
- Өндірістік әдісті талдау (құрал-жабдықтарды өндіруде жұмысының маңызды параметрлері, калибрлеуге қойылатын талаптар)

Орнату квалификациясы (IQ) техникалық құралдарды, инженерлік жүйелер мен жабдықтарды жобаның жұмыс құжаттамасына және өндірушінің ұсыныстарына сәйкес жобаланған, жабдықталған және жинақталған деп растауға бағытталған. Осы кезеңдегі жұмыс көлемі:

- Қажетті құжаттардың болуы
- Жеткізілімдегі барлық элементтердің болуы
- Дұрыс орнату және қосылымдар
- Контактілі материалдардың сәйкестігі
- Өлшеу құралдарының сәйкестігі

Операциялық біліктілік (OQ) техникалық құралдарды, инженерлік жүйелер мен жабдықтардың талап етілетін жұмыс ауқымында дұрыс жұмыс істейтінін құжатталған растауға бағытталған. Осы кезеңдегі жұмыс көлемі:

- Құжаттардың қол жетімділігі (пайдалану, техникалық қызмет көрсету нұсқаулары);
- Операциялық параметрлердің жоғарғы және төменгі шекараларын қамтитын шартты немесе бірқатар серияларды қамтитын сынақтар:

— Блоктау /дабылдарды жандандыру.
Әдетте, біліктіліктің осы сатысынан кейін объект іске қосылды.

Функционалды біліктілігі (PQ) үнемі жұмыс істейтін инженерлік жүйелер үшін, сондай-ақ кешенді басқару жүйесі бар. Өндірістегі біліктілік - бұл техникалық құралдарды, инженерлік жүйелер мен жабдықты бұйымның жаңғыртылатын қасиеттерін алу үшін бір мезгілде (немесе ұзартылған) пайдалану арқылы сенімді түрде пайдалануға болатындығы туралы құжатталған растау. Бұл жағдайда, егер өндірістік жүйе мониторинг параметрлерінің немесе деректерді өңдеудің автоматтандырылған жүйесімен жабдықталған болса, компьютерлендірілген жүйені қосымша тексеру қажет.

Талдау әдістемелерін тексеру

Шикізаттың, жартылай фабрикаттардың немесе дайын өнімнің сапасын бақылау үшін қолданылатын әр аналитикалық және микробиологиялық әдіс валидациядан өтуі керек. Бұл белгілі бір өнімді бақылау үшін осындай техниканың жарамдылығын және, тиісінше, сенімді нәтижелер алу кепілдігін алуымыз керек дегенді білдіреді. Осыған байланысты GMP талаптары ISO 17025 талаптарына толық сәйкес келеді.

Тазалау валидациясы

Жабдықты тазарту процедуралары, осы жабдықта өнімді шығаруға кіріспес бұрын да расталуға тиіс. Ең алдымен, бұл валидация осындай өнімді шығарғаннан кейін жоғары сапалы тазалауды жүргізу мүмкіндігінің кепілдіктерін алуға бағытталған. Шындығында, бұл сол жабдықта басқа өнімді өндіруге ауысқан кезде қақтығыстардың пайда болу қаупін азайтады. Егер бұрынғы өнімнің қалдықтары жабдықта қалса, бұл анықталмайды - өйткені мұндай қоспаларды нақты аналитикалық бақылау жоқ.

Асептикалық жағдайды растау

Асептикалық технологияларды қолдану арқылы стерильді дәрілерді өндіру кезінде, процестің өзі алдында, яғни өндірістік процестің барлық кезеңінде (яғни, процестің ұзақтығы) микроорганизм өнімге енбейтінін растау қажет. Асептикалық жағдайды тексеру имитация сценарийі бойынша коректік ортаны қолдану арқылы жүзеге асырылады.

Технологиялық процесті тексеру

Және тікелей, технологиялық үдерістің әрбір кезеңін тексеру «ең нашар жағдайды» есепке ала отырып қатарынан үш қатарда жүргізіледі. Және, ең бастысы, технологиялық процестің валидациясы әр өнімге және серияның талап етілген өлшеміне бөлек жүргізіледі.

Ең нашар жағдай – бұл үрдістің максималды ауытқу мүмкіндіктерде немесе өнімнің мінсіз жағдайлармен салыстырғанда сәйкессіздігі сияқты жағдайлар мен пысықтауларда процесті. Логика өте қарапайым - егер бұл

жағдайда біз сапалы өнім алсақ, онда көрсетілген диапазондағы сапаға қол жеткізуге кепілдік береміз.

Қайта тексеру / біліктілік

Пайдаланудың (пайдаланудың) көрсетілген кезеңдерінде әрбір объект / процесс екінші валидациядан өтуі керек. Қайта тексерудің негізгі мақсаты объекті / процесс әлі де жарамды күйде екенін растауды алу болып табылады. Бұл GMP логикасын толығымен көрсетеді: «Өнімнің сапасын растау үшін оның өмірлік циклінің басында тексеру жеткіліксіз, мониторинг пен үздіксіз жетілдіруді қамтамасыз ету қажет»

Жоспарлы және жоспардан тыс қайта қарау қарастырылады. Жоспарланған - кестеге сәйкес алдын ала белгіленген кезеңділікке сәйкес жүзеге асырылады (әдетте, 12-24 айдан кейін). Жоспардан тыс қайта басталу - ауытқулар үрдісі немесе өзгерістер енгізу кезінде ұзақ уақыт үзілістен кейін.

Тізім тексеру жұмыстарын жүргізу тәртібімен беріледі

I. Валидтеудің басты жоспары (SDF)

Тексеру шебері жоспары (Validation Master Plan бұдан әрі - VMP) бірінші рет ұйымның нұсқаулары бойынша сұралды Pharmaceutical Inspection Convention (PIC/S) PI 006-1 „Principles of Qualification and Validation in Pharmaceutical Manufacture”. Барлық валидациялық операцияларды жүргізу - бұл бірқатар мамандықтардың мамандарының ынтымақтастығын талап ететін өте күрделі мультидисциплинарлық мәселе. Сондықтан оларда VMP болуы өте маңызды, ол:

- валидацияның жекелеген бөліктерін белгілейді
- әрбір бөліктің сынау көлемін анықтайды
- сынақ процедураларын және хаттамаларды жүргізеді
- еңбек міндеттерін бөледі
- есептер мен құжаттама талаптарына жауапкершілікті бөледі

VMP өндірушісі белгілі бір кезеңде (әдетте бір жыл) орындалатын барлық тексеру жұмыстарын сипаттау үшін дамуы керек. Егер жаңа өндіріс бірлігіне (немесе қайта құрудан кейінгі жұмыс блогына) қатысты валидацияны сипаттау туралы мәселе болса, дербес VMP әзірлеу ұсынылады. Бұл дәрісте жаңа өндіріс бөліміне дайындалған VMP үлгісі төменде келтірілген.

VMP мақсаты

VMP түрлі салалардағы сарапшылар тобы үшін валидация жүргізу тәртібі туралы ақпаратты ұсынғандықтан, ол:

- «Неге, не, кіммен, қалай, қашан» жасалатынын сипаттау
- мемлекеттік құзыретті органға валидация мәртебесі туралы ақпарат береді
- VMP валидациясы арқылы компания тұжырымдамасын көрсетіп, іс жүзінде компанияның басқарушы құжаттарының бірін мәртебесін алады, себебі ол көмектеседі:

- компания басшылығы валидация бағдарламасының (уақыт, персонал, құрал-жабдықтар, ақша) ауқымымен танысады және оның мағынасын түсінеді

- валидтеу комиссиясының мүшелері - міндеттерді және жауапкершілікті бөлу

- жоба менеджерлері процесті бақылауды жүзеге асырады

- GMP инспекторлары валидацияны ұйымдастыруды түсінеді

Тексеру құжаттары Ақпараттың толықтығы үшін валидация құжаттамасының жүйесі төмендегі бөліктерден тұрады:

- Тексеру шебері жоспары (VMP)

- жеке транзакцияларға арналған валидация хаттамалары (VP, validation protocols)

- жеке транзакциялар бойынша растау есептері (VR, validation reports)

- жиынтық растау туралы есеп (SVR, қорытынды растайтын есеп)

Үрдіс

VMP жалпы валидация операциялары үшін әзірленді және сондықтан әрдайым өндірістік және өндірістік емес процестермен байланысты болуы керек. Процестің тұжырымдамасы әрдайым бірден түсінілмейтіндіктен, валидация мақсатында оның әрдайым үш аймаққа қатысты екендігін түсіндіру қажет, оның бағалауы қарым-қатынаста (яғни процесс барысында) орындалуы керек. Келесі бағыттар ескеріледі:

- материалдар (процесте тұтынылатын немесе оның орындалуы үшін қажет болатын немесе нәтижесінде пайда болатын барлық материалдар),

- Жабдықтар (барлық жабдықтар, қосалқы және жүйе және процесті қажет ететін қолдау жүйелері),

- процедуралар (процедуралар мен процедуралар шеңберінде жүзеге асырылатын барлық процедуралар).

Валидациялық комиссия

VMP дамыту үшін жаңа өндірістік бөлімшені дайындаудың бастапқы кезеңінде «валидация комиссиясын» белгілеу маңызды. Комиссия мүшелері іске асыру саласының мамандары (дизайнерлер, техниктер және т.б.), технологияларды (өндірісті білетін), QA / QC филиалдарының өкілдерін және түрлі салалардағы мамандарды (валидация, микробиология және т.б.) болуы керек. VMP дамытудан басқа, комиссия барлық тексеру жұмыстарын ұйымдастырып, алынған нәтижелерді бағалауды жүргізуі керек. Комиссия өз жұмысының негізгі ережелерін қабылдауы жөн. Ең дұрысы, сипаттама фирманың стандартты жұмыс процедурасы (SOP) түрінде пайда болады.

VMP мазмұны

VMP мазмұны PIC/S нұсқауы (PI 006-1) сонымен бірге төмендегі ақпаратты қамтиды:

Кіріспе

- фирма валидациясының тұжырымдамасы
- өндіріс сапасының тұжырымдамасы
- валидацияның көлемі мен мақсаты
- Басымдықтар
- валидация стандарттары мен рәсімдері

2. Валидация бойынша операцияларды ұйымдастыру

- валидация үшін жекелеген операциялар үшін жауапкершілік
- VMP
- жеткізу хаттамалары
- валидацияны жүргізу
- Есептер мен құжаттарды дайындау
- хаттамаларды және есептерді бекіту
- мониторинг және бағалау
- кадрларды дайындау

3. Өндірістік процестің сипаттамасы

- өнімнің сипаттамасы
- өндіріс және шеберханалардың сызбалары
- процестің сипаттамасы (рәсімдер)

4. Ерекше үрдістер

- Өнімнің маңызды параметрлері
- Жабдықтар мен жүйелердің критикалық параметрлері
- процестің сыни нүктелері

5. Тексерудің (тізімнің) көлемі

- Өнімдер (PQ)
- Жабдықтар мен жүйелер (IQ, OQ, PQ)
- рәсімдер (OQ, PQ)

6. Негізгі критерийлер

7. Валидтеу құжаттарының нысаны

- тексеру хаттамалары (OQ, PQ) 1
- Операциялық есептер (IQ, OQ, PQ) 1
- валидация туралы қорытынды есеп

8. Қатысты құжаттама

- ерекшелігі
- өндірістік ережелер мен жұмыс нұсқаулары
- СОП
- Басқа да құжаттар

9. Жоспар - валидтеу кестесі

- рәсімдер
- жабдық
- адамның (жаттығу) уақыты
- Бағасы

10. Басқаруды өзгерту

- материалдар
- жабдық

- рәсімдер. Әрине, біз ВМП-ның әрбір бөлімі туралы жалпы ақпарат бере аламыз, бірақ осы лекцияның мақсаты үшін химиялық заттың өндірісін жаңа өндіріс бөліміне көшірудің үлгісін таңдадық.

Қорытынды

VMP валидацияға арналған негізгі құжаттардың бірі болып табылады. Оның қол жетімділігі құзыретті мемлекеттік органдар тарапынан талап етіледі. Жоспардың даму деңгейі тікелей фирманың (өндірушінің) өндірістік процесстің талаптарын нақты анықтауға және оның прогресін бақылауға мүмкіндік береді. Жақсы дамыған VMP - барлық валидациялық операцияларды дәйекті орындау және бақылау үшін негізгі алғышарттардың бірі.

Тақырыпты пысықтауға арналған сұрақтар:

1. Халықаралық жүйедегі GLP, GCP, GMP, GPP стандарттарына және ұлттық талаптарына сәйкес дәрілік препараттар өндірісі, зерттеу және құрастыруы жаңы түсіндіріңіз?
2. Дәрілік препараттардың өндірісін GMP-дің заманауи талаптарына сай ұйымдастырыңыз?
3. Медициналық фитопрепараттарды әзірлеудегі технологиялық регламентті бағалаңыз?
4. Технологиялық қоспаларды анықтау үшін дайындалатын ерітінділердің фармакопоялық әдістемелерінің валидациясын қарастырыңыз?
5. Медициналық фитопрепараттарды әзірлеудегі технологиялық регламентті түсіндіріңіз?

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Павлов Н.В. Флора Казахстана. - Алматы: Академия наук Казахской ССР, 1960. – Т 3. – С. 179-226.
- 2 Комаров В.П. Флора СССР. - М.: Академия наук СССР, 1936. – Т 6. –С. 2-354.
- 3 Флора Казахстана. - Алма-Ата: АН Каз ССР, 1958. - Т.3. - С. 274-281.
- 4 Amani S. Awaad, D.J. Maitland, Abd El Raheim M. Donia, Saleh I. Alqasoumi, and Gamal A. Soliman. Novel flavonoids with antioxidant activity from a *Chenopodiaceous* plant *Pharmaceutical Biology // Biology and Medicine*. - 2012. –V. 50, №1. –P. 99–104.
- 5 Hao Liu, Yan Mou, Jianglin Zhao, Jihua Wang, Ligang Zhou, Mingan Wang, Daoquan Wang, Jianguo Han, Zhu Yu and Fuyu Yang. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities // *Molecules*. - 2010. – Vol. 15 – P. 7933-7945.
- 6 Mohamed S. Kamela, Khaled M. Mohameda, Hashim A. Hassaneana, Kazuhiro Ohtanib, Ryoji Kasaib, Kazuo Yamasakib. Isolated flavonoid glycosides from *Bassia muricata* // *Phytochemistry* . – 2001. – Vol.57. – P. 1259–1262.
- 7 Кипчакбаева А.К., Ескалиева Б.К., Бурашева Г.Ш., Аиса Н.А. Сверхкритическая флюидная CO₂-экстракция растений рода *Climacoptera* (*Климакоптера*) *C.korshinskyi* (*К.коржинского*) // Материалы Всероссийской школы – конференции молодых ученых «Сверхкритические флюидные технологии в решении экологических проблем». Экстракция растительного сырья.- Архангельск, 2012. - С. 56-57.
- 8 Kipchakbayeva A.K., Eskalieva B.K., Burasheva G.Sh., Aisa N.A. Flavonoids from *Climacoptera subcrassa* // *Chemistry of Natural Compounds*. New York: Springer Science Business Media, 2013. – Vol.48, №6. – P. 1076-1077.
- 9 Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Основы химии природных соединений. Алматы: Қазақ университеті, 2010. – С. 419-437.
- 10 Семенов А.А. Очерк химии природных соединений. - Новосибирск: Наука, 2000. – 664 с.
- 11 Борисенко С.Н., Тихомирова К.С., Шредер Г., Филонова О.В., Максименко Е.В., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Рыбаченко В.И., Борисенко Р.Н., Руднев М.И. Исследование экстрактов корня аралии полученных в среде субкритической воды // Сб. II Всероссийской конференции "Аналитика России". Краснодар, 2009. – С. 379-382.
- 12 Борисенко С.Н., Бичеров А.В. Разработка методов экстракции и модификации изохинолиновых алкалоидов в среде субкритической воды и суперкритического CO₂ // Материалы IX Международного семинара по магнитному резонансу. Ростов-на-Дону, 2008. - С. 77-81.
- 13 Борисенко Н.И., Минкин В.И., Шредер Г., Борисенко Р.Н., Щукина С.Н., Лекарь А.В., Борисенко С.Н. Использование субкритической воды для экстракции биологически активных соединений из растительного сырья //

Тезисы докладов III Международной научно-практической конференции "Сверхкритические флюидные технологии: инновационный потенциал России". Ростов-на-Дону, 2006. - С. 10-14.

14 Тихомирова К.С., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Борисенко Р.Н., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. Экстракция глицирризиновой кислоты из корня солодки в среде субкритической воды. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. – 2008. - Т.3, №3. - С.71-74.

15 Сычев С.Н., Сычев К.С., Гаврилина В.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография на микроколоночных хроматографах серии «Милихром»: Орел ГТУ, 2002. – 134 с.

16 M. Caude, A. Jardy. Chrom Sci Ser 78 (Hand book of HPLC). – 1998. - P 325-333.

17 Паперно Т.Я., Поздняков В.П., Смирнова А.А. Физико-химические методы исследования в органической и биологической химии. – М.: Просвещение, 1977. – 176 с.

18 Atta-Ur-Rahman, Shama Nasim, Irfan Baig, Bilge Sener, Ilkay Orhan, Filiz Ayanoglu, Iqbal Choudhary M. Two new isoflavanoids from the rhizomes of *Iris soforana* // Natural Product Research. - 2004. – Vol.18, №5. – P. 465-71.

19 Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А. Природные флавоноиды. – Новосибирск, 2007. – 280 с.

20 Архипова А.Н. Пищевые красители, их свойства и применение // Пищевая промышленность. - 2000. - №4. - С. 66-69.

21 Государственная Фармакопея РК. – 2008. - Т.1. – 591 с.

22 Государственная Фармакопея РК. – 2009. - Т.2. – 802 с.

23 Государственная Фармакопея СССР. Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. - Вып.1. – 336 с.

МАЗМҰНЫ

Нормативтік сілтемелер.....	2
Анықтамалар, белгілеулер мен қысқартулар.....	3
Кіріспе.....	4
1. Хроматографияның негізгі ережелері.....	6
2. Акуыздарды хроматографиялық тазалауын жүргізудің стандартты шарттары мен қағидалары	10
2.1 Иондық алмасу хроматографиясы.....	10
2.2 Гидрофобты өзара әрекеттесу хроматографиясы.....	14
2.3 Аффиндік хроматография.....	23
2.4 Хромато-Масс-Спектрометрия.....	33
2.5 Жоғарыкритикалық флюидті экстракцияның жетістігі және қолданылуы..	44
2.6 Жоғарыкритикалық жағдайға дейінгі және кейінгі экстракция айырмашылығы.....	47
2.7 Жоғарғы эффективті сұйықтық хроматография (HPLC).....	53
3. Фитопрепараттарды бақылау сапасы және Мемлекеттік өндіріс регламенті.....	65
3.1 Фармацевтикалық технология туралы жалпы түсінік.....	71
3.2 Фармацевтикалық технологиядағы гидродинамикалық процесстер мен аппараттар.....	75
3.3 Стандарттау және сапаны бақылау.....	79
3.4 GSP ережелері – Good Storage Practice.....	80
3.5 Дәрілерді өндірудегі валидациялық процесстер.....	84
Пайдаланған әдебиеттер тізімі.....	93