

УДК 615.32:543.544

DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-9

Зинченко А.А.

СОВМЕСТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ β -ЦИКЛОДЕКСТРАНА И ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ

ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»,
3361085, Украина, г. Харьков, ул. Астрономическая, д. 33
E-mail: Zinchenko@phukr.kharkov.ua

Аннотация. *Актуальность.* Перспективные препараты для лечения целого ряда инфекционных заболеваний наиболее часто представлены многокомпонентными инъекционными лекарственными формами, в состав которых входит набор неорганических солей, антибактериальные и противовирусные вещества, а также вспомогательные вещества, выполняющие роль пролонгаторов и консервантов. От количества этих веществ и их соотношения в составе зависит срок годности препарата и его фармакокинетические характеристики. *Цель исследования.* Разработка и валидация методики совместного определения β -циклодекстрана и поливинилпирролидона в многокомпонентных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). *Материалы и методы.* В данном исследовании осуществлен подбор оптимальных колонки и сорбента для проведения количественного определения ПВП отдельно от β -циклодекстрана методом эксклюзионной хроматографии и выполнена валидация методики по показателям правильность, сходимость (прецизионность), линейность, диапазон применения. В работе использован блочный жидкостный хроматограф модели LC-20 (Shimadzu Co. Япония) и метод хроматографирования с одновременным применением двух колонок. *Результаты.* Подобраны оптимальные колонки для проведения количественного определения ПВП отдельно от β -циклодекстрана методом эксклюзионной хроматографии. Были выбраны колонки: основная – размером 250 мм x 0.46 мм, заполненная сорбентом Equisil ODS, размер частиц 5 мкм, (производство Dr. Maisch, Германия); защитная – размером 20 мм x 4.0 мм Discovery HS C18, размер частиц 5 мкм (Supelco, США). *Заключение.* Методика количественного определения и установления подлинности β -циклодекстрана соответствует всем метрологическим требованиям к методике характеризуется достаточной схожимостью и правильностью. Систематическая ошибка методики для каждого определяемого компонента удовлетворяет требованиям практической незначимости.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; β -циклодекстран; поливинилпирролидон; пролонгаторы; консерванты; фармакокинетика; количественное определение

Информация для цитирования: Зинченко А.А. Совместное определение β -циклодекстрана и поливинилпирролидона в многокомпонентных препаратах методом ВЭЖХ // Научный результат. Медицина и фармация. 2018. Т. 4, N 2. С.81-89. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-9

A.A. Zinchenko

JOINT DETERMINATION OF β -CYCLODEXTRAN AND POLYVINYL PYRROLIDONE IN MULTI-COMPONENT PREPARATIONS WITH A HPLC METHOD

State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Drug Quality Center",
33 Astronomicheskaya St., Kharkov, Ukraine, 3361085
E-mail: Zinchenko@phukr.kharkov.ua

Abstract. *Background.* Promising drugs for the treatment of a number of infectious diseases are most often represented by multicomponent injectable dosage forms, which include a set of inorganic salts, antibacterial and antiviral substances, as well as auxiliary substances that act as prolongators and preservatives. The shelf life of the drug and its pharmacokinetic characteristics depend on the amount of these substances and their ratio in the composition. *The aim of the study.* To develop and validate the procedure for joint determination of β -cyclodextran and polyvinylpyrrolidone in multicomponent preparations by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Materials and methods.* In this study, the optimal column and sorbent was selected for quantitative determination of PVP separately from β -cyclodextran with the method of exclusion chromatography and the validation of the technique was performed using correctness, convergence (precision), linearity, and range of application. In this work, we used a LC-20 block liquid chromatograph (Shimadzu Co. Japan) and a chromatography method with simultaneous application of two columns. *Results.* Optimal columns were chosen for quantitative determination of PVP separately from β -cyclodextran by the method of exclusion chromatography. The following columns were chosen: the main one – 250 mm x 0.46 mm, filled with the Equisil ODS sorbent, particle size 5 μ m, (manufactured by Dr. Maisch, Germany); Protective – size 20 mm x 4.0 mm Discovery HS C18, particle size 5 μ m (Supelco, USA). *Conclusion.* The method of quantitative determination and establishment of the authenticity of β -cyclodextran corresponds to all metrological requirements to the technique characterized by sufficient convergence and accuracy. The systematic error of the technique for each determined component satisfies the requirements of practical insignificance.

Keywords: high-performance liquid chromatography; β -cyclodextrin; polyvinylpyrrolidone; prolongators; preservatives; pharmacokinetics; quantitation.

Information for citation: Zinchenko AA. Sovmestnoye opredeleniye b-tsiklodekstrana i polivinilpirrolidona v mnogokomponentnykh preparatakh metodom VEZHKN [Joint determination of β -cyclodextran and polyvinyl pyrrolidone in multi-component preparations with a HPLC method]. Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(2):81-89. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-9

Введение. Условия количественного определения β -циклодекстрана методом ВЭЖХ описаны в монографии "Betadex" Европейской фармакопеи, а также в фармакопеи США и в многочисленных информационно-рекламных материалах фирм, производящих хроматографические колонки. Наиболее полная информация о режимах

хроматографирования представлена фирмой "Showa Denko К.К.", Япония. При количественном определении по методике Европейской фармакопеи применяют колонку, заполненную сорбентом с октадецильными группами, по методике фармакопеи США анализ проводят на колонке с аминными группами. Условия хроматографирования,

приведенные в рекламных материалах фирмы “Showa Denko К.К.”, предполагают использование эксклюзионных колонок с рабочим диапазоном, начиная с 3000 дальтон [1, 2].

Поскольку в составе препарата присутствуют различные неорганические ионы и высокомолекулярное соединение – ПВП, применять колонку с аминными группами нельзя ввиду происходящих между сорбентом и компонентами пробы необратимых реакций. Применить эксклюзионный режим хроматографирования возможно, но при этом на сорбенте, который обеспечивает необходимое разделение ближайших к β -циклодекстрану веществ (α - и γ -циклодекстранов) получается размытый пик ПВП, который при регистрации на рефрактометрическом детекторе частично, перекрывается с пиком β -циклодекстрана, что существенно ухудшает метрологические характеристики методики. Хроматографирование в условиях монографии “Betadex” Европейской фармакопеи позволяет получить полное разделение хроматографических зон β -циклодекстрана от других компонентов препарата, но при этом время ПВП выхода превышает 120 мин, при том, что время выхода β -циклодекстрана находится в пределах от 5 до 7 мин. Значительное время удерживания ПВП приводит к сильному расширению его хроматографической зоны, при этом чувствительность используемого для регистрации β -циклодекстрана рефрактометрического детектора уже не позволяет получать достоверные результаты количественного содержания ПВП в препарате. А в случае не полного элюирования хроматографической зоны ПВП уже наблюдается невоспроизводимость времен удерживания и площадей пиков β -циклодекстрана из-за модификации сорбента ПВП [3].

Установить время полного элюирования пика ПВП можно проводя одновременно детектирование рефрактометрическим и УФ-ВИД спектрофотометрическим детектором. Использование УФ-ВИД спектрофото-

метрического детектора позволяет существенно увеличить чувствительность регистрации ПВП, поскольку в УФ спектре этого соединения имеется коротковолновый участок, в котором наблюдается достаточно интенсивное поглощение.

Цель исследования: разработка и валидация методики совместного определения β -циклодекстрана и поливинилпирролидона в многокомпонентных препаратах методом ВЭЖХ.

Задачи исследования:

1. Подбор оптимальных колонки и сорбента для проведения количественного определения ПВП отдельно от β -циклодекстрана методом эксклюзионной хроматографии

2. Валидация методики по показателям правильность, сходимость (прецизионность), линейность, диапазон применения.

Материалы и методы исследования.

При разработке данной методики и проведение валидационных исследований использовали блочный жидкостный хроматограф модели LC-20 (Shimadzu Co. Япония) в следующей комплектации:

- два насоса высокого давления модели LC 20 ADvp;
- автоинжектор SIL-20A
- термостат колонок CTO-20A в термостат, в которого вмонтирован 6 ти портовой кран высокого давления FCV-12AN₂
- рефрактометрический детектор RID-10A;
- спектрофотометрический детектор SPD-20A.

Испытуемый раствор препарата готовят путем его разбавления в воде или подвижной фазе, чтобы получить концентрацию β -циклодекстрана и ПВС на уровне около 10 мг/мл и 3 мг/мл соответственно.

Отдельно готовят раствор сравнения β -циклодекстрана и раствор сравнения ПВП с теми же концентрациями.

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения β -циклодекстрана и раствора сравнения ПВП хроматографируют.

Условия хроматографирования:

- основная колонка – размером 250 мм х 0,46 мм, заполненная сорбентом Equisil ODS, размер частиц 5 мкм, (производство Dr. Maisch, Германия);

- защитная колонка – размером 20 мм х 4,0 мм Discovery HS C18, размер частиц 5 мкм (Supelco, США);

- подвижная фаза: вода – метанол (90 : 10);

- скорость подачи подвижной фазы через основную колонку – 1 мл/мин;

- скорость подачи подвижной фазы через защитную колонку – 2 мл/мин;

- длина волны детектирования УФ-ВИД детектором – 226 нм;

- температура термостата колонок – 30 °С;

Концентрацию β-циклодекстрина или ПВС в испытуемом растворе (C_i) определяют по формуле:

$$C_i = \frac{S_i}{S_{oi}} \times C_{oi}$$

где: S_i – среднее значение площадей пиков β-циклодекстрина или ПВП, рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_{oi} – среднее значение площадей пиков β-циклодекстрина или ПВП, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения β-циклодекстрина или раствора сравнения ПВП;

C_{oi} – концентрация β-циклодекстрина или ПВП в соответствующем растворе сравнения, в миллиграммах в 1 мл.

Для устранения негативного влияния ПВП на результаты анализа автором была предложено проводить хроматографирование проб содержащих β-циклодекстрин и ПВП с использованием двух колонок подключенных к 6-ти портовому крану, расположенному в термостате колонок [4]. Одна из колонок выполняет защитную функцию и предотвращает попадание ПВП во вторую, а вторая колонка служит для отделения β-циклодекстрина от других компонентов препарата. Схема подключения колонок показана на рис. 1:

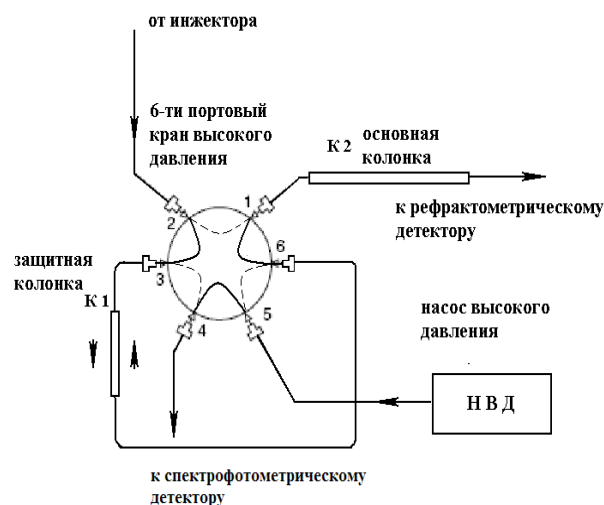


Рис. 1. Схема подключения колонок к 6-портовому крану

Fig. 1. The scheme of connecting the columns to the 6-port tap

Как видно из рис.1, принцип работы этой схемы заключается в том, что в момент введения 6-ти портовый кран находится в положении показанном сплошными линиями на рис. 1 и все компоненты пробы попадают в защитную колонку К1, в которой происходит разделение ПВП от остальных веществ, включая и β-циклодекстрин. Скорость продвижения хроматографической зоны ПВП по колонке 1 составляет около 1 мм/мин и за время нахождения 6-ти портового крана в этом положении (1.5 мин) успевает пройти около 1.5 мм. После переключения 6-ти портового крана поток подвижной фазы направляется в основную колонку К2 уже минуя защитную колонку, а в защитную колонку отдельным насосом подается подвижная фаза в противоположном направлении. Хроматографическая зона ПВП из защитной колонки элюируется и попадает в УФ-ВИД спектрофотометрический детектор, где и происходит ее регистрация. При прохождении подвижной фазы по колонке в обратном направлении происходит фокусировка хроматографической зоны ПВП, за счет чего пик ПВП получается достаточно симметричным.

В основной колонке происходит разделение пиков β-циклодекстрина от остальных

ных компонентов препарата и хроматографическая зона β -циклодекстрана регистрируется рефрактометрическим детектором. Таким образом при одном введении пробы испытуемого раствора происходит определение β -циклодекстрана, и ПВП. Время хроматографирования составляет около 10 мин.

Результаты и их обсуждение. Методики с переключением потоков подвижной фазы и предварительным отделением от других компонентов препарата и концентрированием определяемых веществ в непосредственно ходе проведения анализа мало распространены в практике фармацевтического анализа [6, 7].

Разработанная методика идентификации и количественного определения β -циклодекстрана и ПВП была исследована по показателям: «специфичность», правильность; прецизионность (сходимость), линейность, диапазон применения. Исследования проводили на модельных образцах, полученных в лабораторных условиях с использованием двух вариантов раствора «плацебо» препарата. В первом случае – без β -циклодекстрана, а во втором – без ПВП. Соответствие методики требованиям по по-

казателю специфичность подтверждается следующими данными:

1. На хроматограмме раствора плацебо и хроматограмме растворителя отсутствуют пики со временем удерживания, совпадающим со временем удерживания пиков бетадекса на хроматограмме испытуемого раствора. То есть, все остальные компоненты препарата и растворитель не мешают проведению испытаниям на подлинность и количественному определению β -циклодекстрана.

2. На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы наблюдается полное разделение пиков бетадекса и пиков его ближайших аналогов – α -циклодекстрана и γ -циклодекстрана.

3. Доверительные интервалы времен удерживания пиков β -циклодекстрана на хроматограммах испытуемого раствора и доверительные интервалы времен удерживания пиков β -циклодекстрана на хроматограммах суммарного раствора сравнения перекрываются, т.е. не имеют статистически значимой ошибки. Значения времен удерживания пиков β -циклодекстрана представлены в таблице 1.

Таблица 1

Значения времен удерживания пиков β -циклодекстрана на хроматограммах испытуемого раствора препарата и раствора сравнения β -циклодекстрана

Table 1

The retention times of β -cyclodextran peaks on the chromatograms of the test solution and the β -cyclodextran comparison solution

| № хроматограмм | Значения времен удерживания | |
|------------------------|-----------------------------|---|
| | Испытуемый раствор | Раствор сравнения β -циклодекстрана |
| 1 | 8.664 | 8.645 |
| 2 | 8.638 | 8.657 |
| 3 | 8.639 | 8.648 |
| 4 | 8.651 | 8.647 |
| 5 | 8.637 | 8.654 |
| Среднее значение | 8.646 | 8.650 |
| ОСО | 0.136 | 0.059 |
| Макс. значение | 8.664 | 8.657 |
| Минимальное значение | 8.637 | 8.645 |
| Доверительный интервал | 0.012 (от 8.634 до 8.658) | 0.005 (от 8.645 до 8.655) |

Требование к перекрытию доверительных интервалов значений времен удерживания пиков определяемых веществ на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения представляется более правильным, чем обычно указываемое в НД требование о 2 % совпадении времен удерживания. Поскольку возможен случай, когда доверительные интервалы могут не перекрываться, при этом попадать в 2 % диапазон.

Проведение идентификации по совпадению времен удерживания по разработанной методике для ПВП не корректно, поскольку роль защитной хроматографической

колонки сводится только к отделению хроматографической зоны ПВП от других компонентов препарата, и время удерживания зависит от времени переключения 6-ти портового крана.

Данные о других метрологических характеристиках методики были получены путем хроматографирования модельных растворов с концентрацией ПВП и β -циклодекстрана от 80 % до 120 % от номинального значения. Результаты хроматографирования модельных растворов и расчет метрологических характеристик методики при определении β -циклодекстрана и ПВП представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Результаты анализа модельных смесей препарата, содержащих от 80% до 120 % по отношению к номинальной концентрации β -циклодекстрана, и их статистическая обработка

Table 2

The results of the analysis of model mixtures of the preparation containing from 80% to 120% with respect to the nominal concentration of β -cyclodextran and their statistical treatment

| № раствора | Введено в % от номинальной концентрации (X_i , факт., %) | Найдено в % от номинальной концентрации (Y_i , %) | Найдено в % к введенному $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$ |
|---|---|--|--|
| 1 | 79.740 | 79.709 | 99.962 |
| 2 | 85.000 | 84.789 | 99.752 |
| 3 | 89.942 | 89.783 | 99.823 |
| 4 | 94.855 | 94.495 | 99.620 |
| 5 | 100.231 | 100.291 | 100.060 |
| 6 | 104.913 | 104.508 | 99.614 |
| 7 | 110.087 | 109.913 | 99.842 |
| 8 | 114.827 | 114.364 | 99.597 |
| 9 | 120.202 | 118.748 | 98.790 |
| Среднее, Z_{cp} , % = | | | 99.673 |
| Относительное стандартное отклонение, RSD_z , % = | | | 0.369 |
| Относительный доверительный интервал Δ_z % = $t(95\%, 9 - 2) \times RSD_z = 2.36 \times 0.369 =$ | | | 0.87 |
| Критическое значение для сходимости результатов Δ_{As} , % = | | | 1.6 |
| Систематическая ошибка δ % = $ Z_{cp} - 100 =$ | | | 0.327 |
| Критерий незначимости систематической ошибки: | | | |
| 1) статистическая незначимость: $\delta < \Delta_z : \sqrt{9} = 0.87 : 3 = 0.29\% < 0.327\%$ | | | Не выполняется |
| Если не выполняется 1), то $\delta \leq \max \delta$: | | | Выполняется |
| 2) практическая незначимость: $\delta \% \leq 0.32 \times 1,6 = 0.501\% > 0.327\%$ | | | Выполняется |
| | | | Корректна |

Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что методика количественного определения β-циклодекстрана и ПВП характеризуется достаточной правильностью и сходимостью (прецизионностью) во всем диапазоне концентраций, является корректной и не имеет практически значимой систематической ошибки.

Характеристику «Линейность» исследо-

довали в диапазоне концентраций бетадекса от 80 % до 120 % по отношению к номинальному значению.

Графики линейной зависимости найденного количества бетадекса от введенного для представлен на рис.2, а результаты расчета параметров линейной зависимости – в таблице 3.

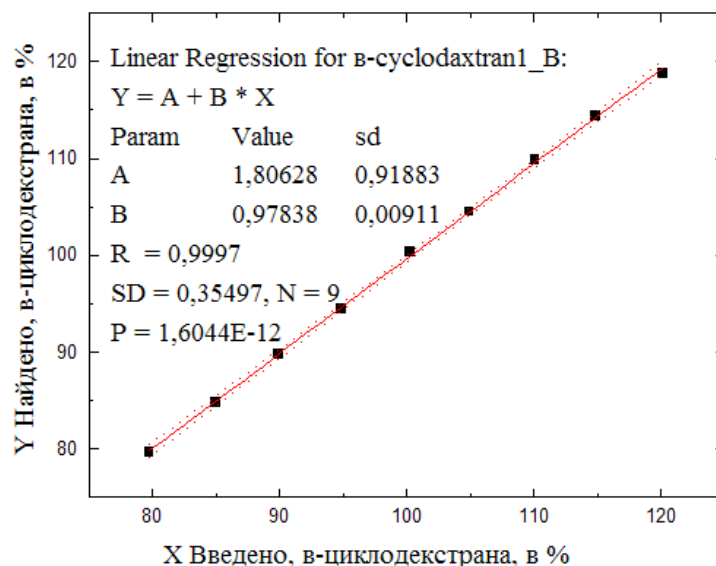


Рис. 2. График линейной зависимости найденного количества β-циклодекстрана от введенного
 Fig. 2. The graph of the linear dependence of the found amount of β-cyclodextran on the introduced amount

Таблица 3

Метрологические характеристики линейной зависимости найденной концентрации β-циклодекстрана от его введенной концентрации

Table 3

Metrological characteristics of the linear dependence of the found concentration of β-cyclodextran on its administered concentration

| Параметры | Значения | Требования 1 | Требования 2 | Заключение |
|---------------------|----------|--------------|--------------|-----------------------------|
| b | 0.97838 | | | |
| S _b | 0.00911 | | | |
| a | 1.80628 | > 0.900 | 2.6 | Выдерживается по 2 критерию |
| S _a | 0.91883 | | | |
| RSD ₀ | 0.35497 | | | |
| RSD ₀ /b | 0.363 | < 0.84 | | Выполняются |
| r | 0.9997 | > 0.9980 | | Выполняются |

Как видно из представленных в таблице 3 данных методика количественного определения и установления подлинности β-циклодекстрана соответствует всем метро-

логическим требованиям к методике характеризуется достаточной сходимостью и правильностью. Систематическая ошибка методики для каждого определяемого компо-

нента удовлетворяет требованиям практической незначимости.

Выводы

1. Подобраны оптимальные колонки для проведения количественного определения ПВП отдельно от β -циклодекстрана методом эксклюзионной хроматографии. Были выбраны колонки: основная – размером 250 мм x 0.46 мм, заполненная сорбентом Equisil ODS, размер частиц 5 мкм, (производство Dr. Maisch, Германия); защитная – размером 20 мм x 4.0 мм Discovery HS C18, размер частиц 5 мкм (Supelco, США);

2. Проведена валидация методики по показателям правильность, сходимость (прецизионность), линейность, диапазон применения.

Методика количественного определения β -циклодекстрана и ПВП характеризуется достаточной правильностью и сходимостью (прецизионностью) во всем диапазоне концентраций, является корректной и не имеет практически значимой систематической ошибки.

Характеристику «Линейность» исследовали в диапазоне концентраций бетадекса от 80% до 120% по отношению к номинальному значению.

Методика количественного определения и установления подлинности β -циклодекстрана соответствует всем метрологическим требованиям к методике характеризуется достаточной сходимостью и правильностью. Систематическая ошибка методики для каждого определяемого компонента удовлетворяет требованиям практической незначимости.

Высокое значение коэффициента корреляции $r = 0.9997$ удовлетворяет требованиям критерия приемлемости ($r = 0.9980$) и подтверждает линейность зависимости между взятым и найденным количеством каждого из действующих веществ препарата в области от 80 % до 120 % относительно их номинальных концентраций в препарате.

Выполняются требования к параметрам линейной зависимости (a , RSD_0/b , r) методики определения β -циклодекстрана во

всем диапазоне концентраций от 80% до 120% от номинального значения.

В отношении данной статьи не было зарегистрировано конфликта интересов.

Список литературы

1. Георгиевский В.П. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств. Харьков: НТМТ, 2011. 946 с.

2. Максимкина Е.А., Миназова Г.И., Чукреева Н.В. Стандартизация и обеспечение качества лекарственных средств. М.: Медицина, 2008. 256 с.

3. Сычев К. Оформление методик высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с международными рекомендациями: Журнал «Аналитика»/ ИП Фирма «СКАН», 2012. С. 60-66.

4. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа: Методическое пособие для специального курса. Москва: Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, 2007. 203 с.

5. Note for guidance on variation of analytical procedures: methodology (CPMP/ICH/281/095). ICH Q2A – Washington, 1995. P. 89-97.

6. Cleaning Validation Guidelines. Health Canada. HPFB Inspectorate – Ottawa: Medicine, 2008. Pp. 45-52.

7. European Pharmacopoeia 8th edition: URL: <http://online.edqm.eu/entry.htm> (Дата обращения: 01.03.2018).

8. The United States Pharmacopoeia 38th edition. United States Pharmacopoeial Convention. URL: [http:// www.uspnf.com/uspnf/login](http://www.uspnf.com/uspnf/login). (Дата обращения: 01.03.2018).

References

1. Georgievsky VP. Analiticheskaya khimiya v sozdanii, standartizatsii i kontrole kachestva lekarstvennykh sredstv [Analytical chemistry in the drug manufacturing, standardization and control]. Kharkiv: NTMT; 2011. 946 p. Russian.

2. Maksimkina EA, Minazova GI, Chukreeva NV. Standartizatsiya i obespechenie kachestva lekarstvennykh sredstv [Provision of drug standardization and quality control]. Moscow: Meditsina; 2008. 256 p. Russian.

3. Sychev K. Oformlenie metodik vysokoefektivnoy zhidkostnoy khromatografii (VEZHh) v

sootvetstvii s mezhdunarodnymi rekomendatsiyami [Design of high performance liquid chromatography (HPLC) techniques in accordance with international recommendations]. Zhurnal «Analitica». 2012:60-66. Russian.

4. Shapovalova EN, Pirogov AV. Khromatograficheskie metody analiza: posobie dlya specialnogo kursa [Chromatographic methods of analysis: a methodological manual for a special course]. Moscow: Moskovskiy Gosudarstvennyy Universitet imeni M.V. Lomonosova; 2007. 203 p. Russian

5. Note for guidance on variation of analytical procedures: methodology (CPMP/ICH/281/095). ICH Q2A – Washington; 1995. P. 89-97.

6. Cleaning Validation Guidelines. Health Canada. HPFB Inspectorate – Ottawa: Medicine; 2008. P. 45-52.

7. European Pharmacopoeia 8th edition [Internet]. [cited 2018 March 1]. Available from: <http://online.edqm.eu/entry.htm>.

8. The United States Pharmacopoeia 38th edition. United States Pharmacopoeial Convention [Internet]. [cited 2018 March 1]. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf/login>.

Зинченко Александр Анатольевич, кандидат фармацевтических наук, заведующий лабораторией фармакопейного анализа

Zinchenko Alexander Anatolyevich, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Head of Pharmaceutical Analysis Laboratory

Статья поступила в редакцию 16 декабря 2017 г.