

Зміст

У ДП «Державний науковий центр лікарських засобів»

Науково-практична конференція «Наукові досягнення в галузі створення лікарських засобів: технологія, аналіз, фармакологія» 4

Міжнародні конференції, семінари, виставки

55-та Пітсбургська конференція та виставка з аналітичної хімії (PITTCON' 2004) 5

До запровадження Державної Фармакопеї України

Жемерова К.Г., Дунай О.В., Шермухамедова О.Г.,

Підпружников Ю.В., Гризодуб О.І., Георгієвський В.П.

Фармакопейні аспекти перевірки придатності методик контролю мікробіологічної чистоти лікарських засобів 9

Гризодуб О.І., Зволінська Н.М., Архіпова Н.М.,

Леонтьєв Д.А., Денисенко Н.В., Доценко Т.М.

Відтворюваність фармакопейних спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських засобів в різних лабораторіях 20

Стандартизація лікарських засобів

Котова Е.Е.

До питання про стандартизацію деяких жирних рослинних олій і препаратів на їхній основі 35

Дем'яненко В.Г., Богрі Хамам Саліх, Зінченко О.А., Дем'яненко Д.В.

Розробка методик контролю якості препарату «Силіцетин» 43

Готові лікарські засоби

Шитєєва Т.А.

Розробка складу та технології трансдермальної терапевтичної системи протизапальної дії 49

Довга І.М., Козлова Н.Г., Замараєва О.Е., Романова Я.Ю.

Вивчення реологічних властивостей супозиторіїв з амінокапроновою кислотою 53

Назарова О.С.

Розробка складу та технологій одержання комбінованих препаратів протизапальної та венотонічної дії на гелевій основі 59

Фітохімічні дослідження

Янченко П.С., Ковальова А.М., Георгієвський Г.В., Комісаренко А.М.

Виділення та вивчення деяких кумаринів і хромонів із рослин родин бобові та селерові та їх ліпазотропна активність 66

Сулейманов Т.А.

Флавоноїди *Astragalus Johanna L.* 73

Фармакологічні дослідження

Іванов Л.В.

Мембранотропні властивості лікарських засобів. Проблеми пошуку, скринінгу та біодоступності 78

Орлова І.М.

Порівняльні експериментальні фармакокінетичні дослідження препаратів троксерутину 83



-
- Заст. головного редактора Спиридонов В.М. (д.фарм.н, професор)
 - Рецензенти: к.фарм.н. Андрюкова Л.М.; д.фарм.н., професор, чл.-кор. НАНУ Георгієвський В.П.; к.б.н. Гладкова Л.В.; д.х.н., професор Гризодуб О.І.; к.фарм.н. Козлова Н.Г.; к.б.н. Лібіна В.В.; д.х.н., професор Литвиненко В.І.; д.фарм.н., професор Ляпунов М.О.; Шеїн А.Т.
 - Випуск підготували Саматов Р.С., Тихоненко Т.М., Нестеренко Л.Л.
 - Рекомендований до друку Вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів», протокол № 5 від 13.05.2004 р.
 - Підписаний до друку 22.06.2004 р. Тираж 500 прим.
-

Проблеми. Пошук. Рішення.*Севигова О.К., Рой І.Д., Левітін Є.Я., Степанова І.І.*

Специфічна корозія та методи захисту елементів фармацевтичного обладнання 88

Аналітичний огляд*Сиденко Л.М., Андрюкова Л.М.*

Органопрепарати в офтальмології та ринології: стан та перспективи 92

Техніко-економічні та маркетингові дослідження*Півень О.П.*

Науково-практичні підходи до оцінки вартості науково-технічної продукції

при підготовці договору на створення лікарського засобу та продажу ліцензії 98

Содержание

В ГП «Государственный научный центр лекарственных средств»

Научно-практическая конференция «Научные достижения в области создания лекарственных средств: технология, анализ, фармакология» 4

Международные конгрессы, семинары, выставки

55-я Питсбургская конференция и выставка по аналитической химии (PITTSCON' 2004) 5

К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины

Жемерова Е.Г., Дунай Е.В., Шермухамедова О.Г.,

Подпружников Ю.В., Гризодуб А.И., Георгиевский В.П.

Фармакопейные аспекты проверки пригодности методик контроля микробиологической чистоты лекарственных средств 9

Гризодуб А.И., Зволинская Н.Н., Архипова Н.Н.,

Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Доценко Т.Н.

Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях 20

Стандартизация лекарственных средств

Котова Э.Э.

К вопросу о стандартизации некоторых жирных растительных масел и препаратов на их основе 35

Демьяненко В.Г., Богри Хамам Салих, Зинченко А.А., Демьяненко Д.В.

Разработка методик контроля качества препарата «Силицетин» 43

Готовые лекарственные средства

Шитеева Т.А.

Разработка состава и технологии трансдермальной терапевтической системы противовоспалительного действия 49

Долгая И.Н., Козлова Н.Г., Замараева Е.Е., Романова Я.Ю.

Изучение реологических свойств суппозиторий с аминокaproновой кислотой 53

Назарова Е.С.

Разработка состава и технологий получения комбинированных препаратов противовоспалительного и венотонизирующего действия на гелевой основе 59

Фитохимические исследования

Янченко П.С., Ковалёва А.М., Георгиевский Г.В., Комиссаренко А.Н.

Выделение и изучение некоторых кумаринов и хромонов из растений семейств бобовые и сельдерейные и их липазотропная активность 66

Сулейманов Т.А.

Флавоноиды *Astragalus Johanna L.* 73

Фармакологические исследования

Иванов А.В.

Мембранотропные свойства лекарственных веществ. Проблемы поиска, скрининга и биодоступности 78

Орлова И.Н.

Сравнительные экспериментальные фармакокинетические исследования препаратов троксерутина 83

Проблемы. Поиск. Решения.

Севигова Е.К., Рой И.Д., Левитин Е.Я., Степанова И.И.

Специфическая коррозия и методы защиты элементов фармацевтического оборудования 88

Аналитический обзор

Сиденко Л.Н., Андрюкова Л.Н.

Органопрепараты в офтальмологии и ринологии: состояние и перспективы 92

Технико-экономические и маркетинговые исследования

Пивень Е.П.

Научно-практические подходы к оценке стоимости научно-технической продукции при подготовке договора на создание лекарственного средства и продаже лицензии 98

У ДП «Державний науковий центр лікарських засобів»

6-8 апреля 2004 года
в ГП «Государственный научный центр лекарственных средств»
состоялась открытая научно-практическая конференция
молодых ученых и специалистов

Научные достижения в области создания лекарственных средств: технология, анализ, фармакология

Конференция организована Советом молодых ученых ГП ГНЦЛС при содействии Ученого совета и администрации ГП ГНЦЛС. Актуальность проведения конференции обусловлена важностью подготовки научных кадров высшей квалификации в ГП ГНЦЛС, на химико-фармацевтических заводах Украины, а также привлечения молодых специалистов предприятий фармацевтической отрасли в науку.

На конференции молодым соискателям ученой степени кандидата наук была представлена возможность доложить результаты научных исследований, провести предварительную апробацию работ. Цель конференции — оценить уровень и актуальность диссертационных работ, их соответствие современным требованиям ВАК.

Для участия в конференции были приглашены специалисты, планирующие защиту диссертации в специализированном Ученом совете ГП ГНЦЛС по специальности 15.00.03 (стандартизация и организация производства лекарственных средств), а также молодые ученые Центра.

Участники и гости конференции — специалисты ГП ГНЦЛС, ГП НЭФЦ, Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины, фармацевтических предприятий ХФЗ «Красная звезда», ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье», ООО «Вега», ОАО «ФармаСтарт», ООО «Фармак». Всего на конференции присутствовало более 120 человек.

В своем вступительном слове председатель президиума научно-практической конференции, директор ГП ГНЦЛС, член-корреспондент НАН Украины, Заслуженный деятель науки и техники Украины, профессор, доктор фармацевтических наук Виктор Петрович Георгиевский отметил, что ГП ГНЦЛС является не только центром по созданию отечественных лекарственных препаратов, но и кузницей кадров для фармацевтической от-

расли, в связи с чем научный центр выдвигает большие требования к подготовке специалистов высшей квалификации.

На конференции было представлено 36 докладов, которые можно разделить на несколько тематических блоков: технология (16 докладов), анализ и стандартизация (9 докладов), фармакология и микробиология (7 докладов), контроль качества лекарственных средств (4 доклада).

Доклады сопровождалась демонстрацией иллюстративных материалов.

Доклады представителей химико-фармацевтических предприятий отрасли были посвящены усовершенствованию технологии и внедрению в производство новых препаратов (**Бронина Е.А.** «Актуальность создания отечественного поликомпонентного кальцийсодержащего препарата — «Кальций-Остевит»» (ОАО «Красная звезда», Харьков); **Зубченко Т.Н.** «Разработка усовершенствованной комплексной технологии получения препаратов из расторопши пятнистой» (ООО ФК «Здоровье», Харьков)), разработке новых методик аналитического контроля и валидации производственного процесса (**Ханин В.А.** «Разработка и валидация методик контроля препарата на основе эналаприла и гидрохлортиазиды методом жидкостной хроматографии» (ООО ФК «Здоровье», Харьков); **Литовчук Е.В., Бочарова И.А.** «Исследование влияния структуры полимеров на высвобождение лекарственных веществ из матричных таблеток на основе геля» (ОАО «ФармаСтарт», Киев); **Янченко П.С.** «Изучение липазотропной активности препарата «Пифламин» (ООО «Вега», г. Харьков)).

Каждый доклад сопровождался обсуждением, в котором принимали участие ведущие специалисты ГП ГНЦЛС Гризодуб А.И. — д.х.н., профессор.; Дихтярев С.И. — д.фарм.н., профессор; Маслова Н.Ф. — д.б.н., профессор; Ляпунов Н.А. — д.фарм.н., профессор; Казаринов Н.А. — д.фарм.н., профес-

сор; Литвиненко В.И. — д.х.н., профессор и др. специалист Центра.

На заключительном заседании был подведены итоги конференции. В обсуждении результатов конференции выступили председатели и сопредседатели пяти заседаний. С заключительным словом выступил зам. директора по научной работе ГП ГНЦЛС д.фарм.н., профессор Дихтярев С.И., который отметил, что большинство работ уже в этом году может быть представлено к апробации или защите (**Крамаренко Е.А.** «Фармакологическая эффективность оргиазы при ферментной недостаточности пищеварения и возможность ее применения с панкреатинсодержащими препаратами»; **Жемерова Е.Г.** «Стандартизация методов испытания микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств»; **Морозюк А.В.** «Аналитическое обеспечение разработки глазных капель с экстрактом алоэ»; **Назарова Е.С.** «Разработка состава и стандартизация производства комбинированного препарата противовоспалительного действия на гелевой основе»; **Столпер Ю.М.** «Создание лекарственных средств в форме суппозиториев с антисептиками для интравагинального применения»), поблагодарил за участие, актуаль-

ные и интересные доклады представителей предприятий отрасли, а также сотрудников Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины (**Архипова Н.Н.** «Использование промышленных таблеток в качестве тестовых образцов для профессионального тестирования лабораторий»; **Зволинская Н.Н.** «Влияние невоспроизводимости оптической плотности спектрофотометров на результаты лабораторий в программах профессионального тестирования»; **Рубан Н.В.** «Создание системы государственного контроля качества и безопасности донорской крови, ее компонентов и изготовленных из них препаратов в Украине в соответствии с современными требованиями»; **Острица Т.В.** «Фальсификация лекарственных средств в Украине, разработка подходов к решению проблемы»).

Организаторы конференции выражают огромную благодарность предприятиям отрасли ООО «Фармак», ООО »НПФ «ЭЙМ», ООО «Вега», оказавшим спонсорскую помощь в проведении конференции.

Доклады участников конференции будут опубликованы в журнале «Фармаком» в виде научных статей.

Міжнародні конференції, семінари, виставки

55-я Питсбургская конференция и выставка по аналитической химии (PITTSOON' 2004)

55-я Питсбургская конференция и выставка по аналитической химии (Pittcon' 2004) проходила в Чикаго (США, штат Иллинойс) с 7 по 12 марта 2004 года.

Этот крупнейший международный форум ежегодно собирает около 30 000 специалистов в области аналитической химии со всего мира.

На конференцию было заявлено более тысячи устных и более 600 стендовых докладов, в том числе 3 из Украины (2 устных и один стендовый). В рамках конференции было проведено 115 кратких курсов повышения квалификации, рассчитанных как на студентов и аспирантов, так и на специалистов. Более 1000 компаний и фирм представляли на выставке оборудования новейшие приборы, химические реактивы, новинки компьютерного обеспечения и научные сообщения.

Техническая программа конференции состояла из 260 сессий, в том числе форумов, пленарной лекции, специальных устных и стендовых сессий, семинаров и практикумов. Специализированные доклады были сгруппированы в 66 симпозиумов.

Открывали конференцию форумы. Это одна из новаций в работе конференции. Тематика форумов была ориентирована на новые разработки в различных областях аналитической химии. Значительное внимание было акцентировано на последних достижениях в области биоаналитической химии (bio and life science innovations). Как достижения в этой области представлялись оборудование для автоматической очистки белков («Amersham», «Bioscience»), их анализа в потоке с применением ВЭЖХ («Groton Biosystems»), новые технологии экстракции нуклеиновых

кислот, белков и молекул с низкой молекулярной массой из клеток («Gilson Inc.», «CombiSep Inc.»), электрохимические детекторы для капиллярной газовой хроматографии («GL Science Inc.»), высокоточные весы («Labconco Corp.»).

На форуме, посвященном аналитической инструментальной технике (Process Analytical Instrumentation), среди новинок привлекли внимание ИК-спектрометр для работы в ближней и средней области с импульсным лазерным источником возбуждения («Bruker Optics and TeraView Ltd», «Wilks Enterprise Inc.»), волоконная оптика для спектрометров в ближней ИК, видимой и УФ - областях («Ceram Optec Industries»). Фирма «Waters» представила новое оборудование в области жидкостной хроматографии — UPLC — хроматограф сверхвысокого разрешения. Наиболее массовыми были новые разработки в области масс-селективных детекторов.

На форуме, посвященном успехам в анализе объектов окружающей среды (Environmental Application), были представлены новые автоматические анализаторы воды («SEAL Analytical Inc.»), самокалибрующиеся мини-анализаторы для анализа объектов на месте отбора проб («Lachat Instruments-Nach»), переносной портативный масс-спектрометр для экологических лабораторий («Griffin Analytical Technologies»).

Проведены форумы, посвященные характеристикам различных материалов, где было представлено новое оборудование, в частности, для анализа поверхности, а также форум по организации, управлению и программному обеспечению современной аналитической лаборатории. Участники форумов имели возможность получить детальную информацию об интересующих их разработках от представителей фирм.

Дополнением к материалам форумов была стендовая сессия, включающая 63 доклада. В рамках форумов состоялись также три рабочие встречи, касающиеся успехов в развитии высокоэффективной жидкостной хроматографии, организации работы современной аналитической лаборатории, а также вопросов аналитического образования.

Пленарная лекция, прочитанная профессором Ларри Фолкнером - президентом университета штата Техас в Остине, носила название «Good Chemical Measurements and Good Public Policies» и была посвящена возросшей роли аналитической химии в жизни

общества, оптимистическим перспективам на будущее, важности правильной интерпретации результатов аналитических измерений, их влиянию на общественные дебаты и на формирование общественной политики. Поднимались вопросы вовлечения этой области науки в воспитание лидеров нового поколения и граждан современного общества.

Большой интерес вызвали лекции двух лауреатов Нобелевской премии по химии 2002 года - Коихи Танака (Koichi Tanaka), Япония, и Кюрта Вютриха (Hurt Wutrich), Швейцария. Совместно с Джоном Фенном (J. Fenn), США, они получили премию за разработку методов анализа белков и макромолекул, включающих ионизацию электрораспылением и мягкую лазерную десорбцию с последующим масс-спектрометрическим детектированием, а также использование ЯМР-спектроскопии для определения трехмерной структуры этих молекул.

Следует отметить две специальные сессии под общим названием Howard V. Malmstand, посвященные большому вкладу этого ученого из университета штата Иллинойс в развитие аналитической науки и образования. На сессиях был заслушан 21 доклад, представленный его учениками и сотрудниками со всего мира, работавшими с ним.

Симпозиумы и сессии включали рассмотрение актуальных вопросов аналитической химии. Среди методов аналитической химии наиболее широко рассматривались хроматографические и спектроскопические методы, в частности ИК- и КР-спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеивания), масс-спектрометрия и лазерная спектроскопия.

Так, достижениям в области ИК и КР - спектроскопии были посвящены 3 симпозиума, две устные сессии, стендовая сессия. Было проведено несколько сессий по применению КР-микроскопии в анализе, в частности в анализе поверхности. Несколько симпозиумов, а также устных и стендовых сессий было посвящено новым разработкам в области масс-спектрометрии, в частности масс-спектрометрии с индукционно-связанной плазмой и масс-спектрометрии с лазерной десорбцией, также рассматривались достижения в области объединения метода масс-спектрометрии и микроскопии (Imaging Mass Spectrometry).

Проблеме высокоэффективной жидкостной хроматографии было посвящено два симпозиума, где, в частности, рассматрива-

лись вопросы повышения скоростей в ВЭЖХ, теоретические и практические вопросы ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Несколько сессий было посвящено газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, одна сессия была посвящена ионной хроматографии.

Важное место среди методов концентрирования и определения, отраженных на конференции, занимал капиллярный электрофорез, планарная и капиллярная электрохроматографии, экстракция, ионный обмен.

Не были обойдены вниманием и химические сенсоры. Был представлен ряд докладов по сенсорным покрытиям, содержащим ионофоры, которые применялись для модифицирования ион-селективных электродов, угольных электродов и электродов, полученных по технологии печати (screen-printing), а также для получения оптодов (оптических датчиков). Модифицированные таким образом электроды использовались для амперометрического детектирования полиионов, например белков или ДНК. Полученные оптоды применялись для измерения pH растворов, анализа *in vivo* глюкозы, для анализа объектов окружающей среды.

Применению флуоресцентной и ИК-спектроскопии для исследования быстрых реакций (Real time spectroscopic technique to fast processes, kinetics and throughput screening) был посвящен отдельный симпозиум. Там рассматривались методы анализа быстрых реакций в биологических системах, изученных методом остановленной струи, реакции на границе раздела жидкость/твердое тело методом time resolved флуоресцентной и КР-спектроскопии.

Нельзя не упомянуть такое перспективное направление аналитической химии как микроанализ и нанотехнологии. Часть докладов была посвящена созданию нано-сенсоров для анализа органических и неорганических веществ в различных объектах. Наиболее интересными были разработки сенсоров по изучению компонентов внутренней структуры клеток, строению биочастиц на нано-уровне.

Вопросам электрохимии было посвящено две устных и одна стендовая сессии. Отдельно рассматривались возможности электроаналитических методов для характеристики материалов, а также достижения в области нано-электрохимии.

Часть симпозиумов и сессий была посвящена практическому приложению достижений аналитической химии. Следует отметить

такие новые прикладные области аналитической химии, как борьба с терроризмом, агротерроризмом, анализ химического и биологического оружия, анализ взрывчатых и отравляющих веществ.

Отдельно были проведены симпозиумы и сессии по применению аналитической химии в судебной экспертизе и медицине, в частности, были представлены доклады по анализу чернил, пигментов, красителей методом масс-спектрометрии с лазерной десорбцией, анализу ДНК методом масс-спектрометрии; по использованию методов аналитической химии в диагностике рака, применению микрочипов в медицинской диагностике, детектированию летучих веществ в выдыхаемом пациентами воздухе методами газовой хроматографии с предварительным сорбционным концентрированием и последующей диагностикой заболеваний.

Более десяти симпозиумов и сессий рассматривали проблемы анализа биологических объектов, а именно: анализ белков, аминокислот и липидов, анализ ДНК и РНК, анализ бионаночастиц, изучение и моделирование биомембран. Часть сессий и симпозиумов была посвящена разработке методов разделения биомолекул, анализу отдельных клеток, нейрохимии, применению спектроскопических, хроматографических и масс-спектрометрических методов в биоаналитике. Отдельные сессии были посвящены капиллярному электрофорезу.

Не были обойдены вниманием на конференции такие важные прикладные направления аналитической химии, как анализ фармацевтических материалов, анализ объектов окружающей среды и пищевых продуктов.

В рамках симпозиума и сессий, посвященных анализу фармацевтических материалов, рассматривались методы пробоподготовки, вопросы применения методов спектрофотометрии, в частности волоконной оптики, электрохимии, ЯМР-спектрометрии, масс-спектрометрии, жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, в анализе. Отдельно рассматривались проблемы хирального анализа, были заслушаны доклады, посвященные разработке стандартных образцов для фармацевтической отрасли.

Актуальными остаются проблемы анализа объектов окружающей среды. Этим вопросам были посвящены несколько симпозиумов и сессий, включающих как анализ органических компонентов, так и металлов в окружа-

ющей среде. Наибольшее количество докладов касалось анализа летучих органических веществ, фенолов, органогалогенидов, органических суперэкоотоксикантов, изучения форм существования ионов металлов, в частности мышьяка, хрома в воде, анализа следов тяжелых металлов в воде, грунте и воздухе. Наиболее широко в этой области анализа использовались методы молекулярной и атомной спектроскопии, хроматография, масс-спектрометрия с ИСП. Отдельно было проведено четыре сессии, посвященных скринингу, использованию сенсоров в анализе окружающей среды, а также экомониторингу. Предложены биосенсоры для анализа фосфаторганических пестицидов, электрохимические сенсоры для определения следовых количеств комплексов металлов, лазерные сенсоры для анализа проб воздуха, электрохимические сенсоры на основе углеродных нанотрубок для анализа фенолов, пестицидов, аминокислот, белков в окружающей среде.

Отдельная сессия была посвящена анализу на месте отбора проб, где рассматривались анализ природных объектов, в частности, анализ проб воздуха с помощью миниатюрного газового хроматографа, применение портативного масс-спектрометра для анализа проб грунта и воды; скрининг багажа и одежды пассажиров на предмет наличия взрывчатых веществ с помощью спектрометра ионной подвижности.

Один симпозиум и несколько сессий были посвящены анализу пищевых продуктов, в частности экспресс-анализу сельскохозяйственной продукции. Рассматривались методы анализа генетически модифицированной продукции (семян) на основе их экспресс-ДНК анализа, применение капиллярного электрофореза и УФ-спектрофотометрии для определения аминокислот и белков, поднимались также вопросы усовершенствования пробоподготовки при анализе семян и пищевых продуктов

Вопросы будущего аналитической химии и образования нашли свое отражение на двух симпозиумах, где, в частности, подчеркивалось, что будущее аналитического образования включает связь с различными областями науки, в первую очередь с биологией и медициной, развитие междисциплинарных наук - биогеохимии, нанотехнологии, биотехнологии, наук об окружающей среде, развитие микроанализа, например анализа единичных молекул. Говорилось о необходимости разра-

боток новых компьютерных обучающих программ для студентов, создания специальных вебсайтов по наиболее широко используемым методам анализа. Отмечалась важность связи химического образования с проблемами региона. Один из докладов украинских ученых также был посвящен проблемам развития и преподавания аналитической химии в Украине.

Ряд симпозиумов был посвящен вручению премий выдающимся ученым.

Питсбургскую премию по аналитической химии получил профессор университета штата Миннесота Питер Карр (Peter Carr) за разработки в области электрохимии и хроматографии.

Премия в области спектроскопии была вручена профессору университета штата Иллинойс Полю Бону (Paul W. Bohn) за разработку подходов исследования спектроскопическими методами взаимодействий на границе раздела твердая/твердая и твердая/жидкая фазы.

Обладателем премии Бомем-Михельсона (Bomem-Michelson Award), присуждаемой обществом Кобленц (Coblentz Society), стал профессор Дэвид Хааланд (David M. Haaland) (Международная лаборатория Сандия (Sandia International laboratory)) за достижения в области ближней и средней ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием.

Общество электроаналитической химии учредило премию имени Ч.Н. Рейли (Ch.N. Reilly Award) за выдающиеся успехи в области аналитической химии и фундаментальной электрохимии. Премия была присуждена профессору Адаму Хэллеру (Adam Heller) (университет штата Техас, Остин) за разработку методов получения микроэлектродов - чипов, модифицированных биомолекулами.

Перспективная премия имени Дала Ногаре (Dal Nogare Award) вручена профессору Милошу Новотному (Milos V. Novotny) (университет штата Индиана) за выдающиеся работы в области хроматографии.

Премия молодых ученых получил Джеффри Лонг (Jeffrey Long) (Военно-морская исследовательская лаборатория) за разработку полимерных нанопокрываний электродов.

Было вручено еще четыре премии за работы в области биосенсоров и биотехнологий, ближней ИК-спектроскопии, микроскопии, а также за повышение престижа аналитической химии в мире (prof. Paul Wilks).

В рамках конференции был проведен ежегодный симпозиум Джеймса Уотера (James

Waters), посвященный оборудованию для гель-проникающей хроматографии. Цель симпозиума - отметить успехи в разработке аппаратуры в этой области аналитической химии. Трое представителей компаний по производству оборудования для гель-проникающей хроматографии Джеймс Уотер (James Waters), Роберт Лимперт (Robert Limpert), Клей Энос (Clay Enos), а также ученый из Мичиганского университета Теодор Провдер (Theodore Provder), работающий в этой области, представили доклады по развитию данного метода анализа и проблем анализа полимеров.

На симпозиуме по управлению лабораториями большое внимание уделялось системам управления лабораторной информацией (Laboratory Information Management System), использованию инструментальных средств и компьютеров в управлении современной лабораторией. Одна из рабочих встреч под названием "безбумажная лаборатория" касалась новинок в области компьютерного и программного обеспечения аналитических лабораторий, на ней отмечалась необходимость перехода на безбумажную информацию.

Поднимались также вопросы валидации и аккредитации аналитических лабораторий, в частности лабораторий по анализу объектов окружающей среды, рассматривались подходы по профессиональному тестированию аналитических лабораторий, говорилось о необходимости объединения лабораторий, разработок общих программ, а также глобализации аналитических организаций.

56-я Питсбургская конференция состоится в Орландо, США, штат Флорида, с 27 февраля по 4 марта 2005 года. Из наиболее приоритетных направлений будущей конференции отмечаются нанотехнологии, судебная медицина, антитерроризм, биоаналитика, науки о живом, анализ пищевых продуктов, анализ фармацевтических продуктов, методы скрининга, анализ объектов окружающей среды.

В.М. Зайцев

д.х.н., профессор, зав. кафедрой аналитической химии Киевского национального университета, Председатель научного совета по аналитической химии Национальной академии наук Украины

До запровадження Державної Фармакопеї України

УДК 615.076

Жемерова Е.Г., Дунай Е.В., Шермухамедова О.Г., Подпружников Ю.В., Гризодуб А.И., Георгиевский В.П.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

Государственная служба лекарственных средств и изделий медицинского назначения

Фармакопейные аспекты проверки пригодности методик контроля микробиологической чистоты лекарственных средств

Предложен статистически обоснованный подход к проверке пригодности методик контроля микробиологической чистоты в соответствии с требованиями ГФУ. Проведена экспериментальная проверка его применимости на примере проверки пригодности метода мембранной фильтрации с предфильтром для контроля микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств. Показано, что метод мембранной фильтрации с использованием в качестве предфильтра адсорбционных подложек, входящих в комплект мембранных фильтров НАЕР 047 АW производства фирмы «Millipore», удовлетворяет требованиям ГФУ к пригодности методики и может быть использован для контроля микробиологической чистоты лекарственных средств.

Одним из важнейших аспектов разработки методик контроля микробиологической чистоты (МБЧ) лекарственных средств (ЛС) является проверка пригодности, которая в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) [1], является обязательной. Однако ГФУ, как и другие

Фармакопеи (Европейская Фармакопея, Фармакопея США), устанавливает лишь общие требования и подходы к контролю качества ЛС, оставляя решение конкретных вопросов самим разработчикам. Основным вопросом, возникающим при проверке пригодности методики испытания МБЧ, является воп-

рос корректной постановки эксперимента и статистически обоснованной интерпретации полученных результатов.

Такие вопросы характерны для всех методов, однако в случае методик контроля МБЧ ситуация усугубляется невозможностью получения модельных образцов с точным содержанием микроорганизмов, а также принципиальной неоднородностью анализируемых образцов по содержанию микроорганизмов. В то же время, без такой оценки сложно доказать корректность предлагаемой методики контроля МБЧ и подтвердить пригодность методики в соответствии с требованиями ГФУ [1].

В последние несколько лет в научной литературе активно дискутируется вопрос о корректности использования для контроля МБЧ метода мембранной фильтрации с предфильтром, рекомендованного для испытания нерастворимых в воде лекарственных средств как одного из способов предварительного отделения нерастворимых частиц при проведении мембранной фильтрации. К сожалению, публикации противников данного метода носят в основном эмоционально-лингвистический характер и не содержат какой-либо статистической оценки полученных экспериментальных данных [2, 3], что не позволяет судить о научной значимости и корректности их выводов.

Целью данной работы является попытка разработать статистически обоснованные подходы к проверке пригодности методик испытания МБЧ и продемонстрировать их практическое использование на примере проверки пригодности материала предфильтра.

1. Теоретическая часть

1.1. Интерпретация полученных результатов

В соответствии с требованиями ГФУ [1], методика испытания на МБЧ считается пригодной, когда результаты, полученные при подсчете каждого из тест-микроорганизмов в присутствии (опыт) и в отсутствие (контроль) испытуемого образца, отличаются не более чем в 5 раз.

Нетрудно видеть, что формулировка ГФУ допускает несколько разных подходов, которые могут привести к различным выводам, в частности:

1. Проводится один контроль и один опыт. Рассчитывается отношение (R_i) результатов

контроля (K) к результатам опыта (T). Результаты не должны отличаться более чем в 5 раз, т.е. должно выполняться соотношение:

$$0.2 \leq R_i = \frac{K}{T} \leq 5.0. \quad (1)$$

2. Проводится n контролей и n опытов. Рассчитываются n отношений (R_i) результатов контроля к результатам опыта. Для всех R_i должно выполняться соотношение:

$$0.2 \leq R_i \leq 5.0. \quad (2)$$

3. Проводится n контролей и n опытов. Рассчитываются n отношений (R_i) результатов контроля к результатам опыта. Рассчитывают среднее значение \bar{R} . Должно выполняться соотношение:

$$0.2 \leq \bar{R} \leq 5.0. \quad (3)$$

Все соотношения (1-3) являются статистически некорректными по следующим причинам:

(1) — нельзя делать заключение о пригодности методики по данным только одного опыта, поскольку доверительный интервал в этом случае является величиной неопределенной;

(2) — при достаточно больших выборках (n) могут наблюдаться значительные отклонения от генеральных значений, которые не являются статистически значимыми;

(3) — не учитывается ни размер выборки (n), ни ее дисперсия.

Статистически корректная интерпретация результатов проверки пригодности методики должна учитывать наличие доверительных интервалов величин R_i и \bar{R} [4] для заданной доверительной вероятности. В аналитической практике обычно используют доверительную вероятность 95 % [4], которую мы и будем использовать далее.

В случае соотношения (1) доверительный интервал является величиной неопределенной (бесконечной), поэтому данное соотношение далее рассматриваться не будет.

Следует отметить, что величины R_i и \bar{R} являются несимметричными — они могут быть как угодно велики, но не могут быть меньше нуля. В случае малых отклонений этих величин от единицы эти малые отклонения можно считать имеющими нормальное распределение (в частности, это предположение используется для статистической обработки всех результатов количественного определения, которые также не могут быть меньше нуля). Однако в случае контроля МБЧ стан-

дартные отклонения столь велики, что легко можно получить доверительные интервалы, охватывающие отрицательные значения R_i и \bar{R} , не имеющие физического смысла. Поэтому целесообразно перейти к десятичным логарифмам величин R_i . Величины $\lg R_i$ являются симметричными, достаточно малыми и могут считаться распределенными нормально.

В этом случае [4]:

$$\begin{aligned} \overline{\lg R} &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \lg R_i, \\ SD(\lg R) &= \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\lg R_i - \overline{\lg R})^2}, \\ \Delta(\lg R) &= t(95\%, n-1) \cdot SD(\lg R), \\ \overline{R} &= 10^{\overline{\lg R}}. \end{aligned} \quad (4)$$

Тогда, в случае соотношения (2) учет доверительных интервалов приводит к следующему выражению [4]:

$$\begin{aligned} R_{high} &= \text{anti} \lg[\overline{\lg R} + \Delta(\lg R)] \leq 5.0 \\ R_{low} &= \text{anti} \lg[\overline{\lg R} - \Delta(\lg R)] \geq 0.2. \end{aligned} \quad (5)$$

Соотношение (5) устанавливает, что 95 %-ная верхняя граница величин R_i не должна быть больше 5.0, а 95 %-ная нижняя граница не должна быть меньше 0.2. Отметим, что соотношение (5) устанавливает краевые ограничения как сверху, так и снизу, поэтому в них используется коэффициент Стьюдента для двухсторонней вероятности 95 % [4].

Аналогично, для выражения (3) получим [4]:

$$\begin{aligned} \overline{R_{high}} &= \text{anti} \lg[\overline{\lg R} + \frac{\Delta(\lg R)}{\sqrt{n}}] \leq 5.0 \\ \overline{R_{low}} &= \text{anti} \lg[\overline{\lg R} - \frac{\Delta(\lg R)}{\sqrt{n}}] \geq 0.2. \end{aligned} \quad (6)$$

Соотношение (6) устанавливает, что 95 %-ная верхняя граница величин \bar{R} не должны быть больше 5.0, а 95 %-ная нижняя граница не должна быть меньше 0.2.

Для того чтобы сделать выбор между соотношениями (5) и (6), необходимо учитывать условия проведения испытаний на МБЧ. В соответствии с ГФУ [1], при проведении испытания на МБЧ методом мембранной фильтрации испытание следует проводить в одной повторности. Таким образом, для статистически корректной интерпретации результатов проверки пригодности методики следует использовать соотношения (4, 5), а не (4, 6).

1.2. Требования к систематической погрешности методики контроля МБЧ

Величина \bar{R} из соотношения (4) не должна значимо отличаться от единицы, т.е. доверительный интервал $[R_{low}, R_{high}]$ из соотношения (6) должен включать единицу. В логарифмической шкале это означает, что величина $\lg R$ не должна значимо отличаться от нуля. В противном случае такая методика контроля МБЧ характеризуется систематической погрешностью, занижая реальную загрязненность микроорганизмами анализируемого лекарственного средства. В общем случае, методики анализа не должны иметь систематической погрешности [4]. Однако данное требование без конкретизации объема выборки n носит неопределенный характер. Действительно, из соотношений (4) и (6) видно, что уменьшение объем выборки n приводит к увеличению доверительных интервалов — из-за уменьшения знаменателя \sqrt{n} и из-за роста в числителе коэффициента Стьюдента $t(95\%, n-1)$. Таким образом, уменьшая объем выборки (а с ней и точность методики), мы можем добиться статистической незначимости систематической погрешности. Примером такого «способа» нивелирования систематической погрешности могут служить, например, результаты, полученные для *P. aeruginosa*, ПП/(Ф+П), где $n = 4$ (Табл. 4).

С другой стороны, систематическая погрешность конкретной методики может быть значима статистически (особенно для точных методов), но незначима практически в рамках поставленной задачи. В случае проверки пригодности методики контроля МБЧ критерием такой практической незначимости является то, что систематическая погрешность не должна значимо влиять на принятие решений о пригодности методики по ГФУ [1]. Для этого систематическая погрешность должна быть незначима по сравнению с максимально допустимым различием опыта и контроля, т.е. максимальное значение модуля $\lg R$ должно быть незначимо по сравнению с логарифмом R_{high} из соотношения (5) [5]:

$$\begin{aligned} \max |\lg \bar{R}| &= 0.32 \cdot \lg R_{high} = \\ &= 0.32 \cdot \lg 5.0 = 0.224 \\ \max \bar{R} &\leq 10^{0.224} = 1.67. \end{aligned} \quad (7)$$

Таким образом, значение \bar{R} должно или статистически незначимо отличаться от единицы, или, если это не выполняется, не превосходить величины 1.67. В этом случае мож-

но говорить о том, что методика контроля МБЧ не характеризуется практически значимой систематической погрешностью.

1.3. Фактор задержки

При оценке пригодности материала предфильтра представляет интерес фактор задержки микроорганизмов (MRF) — доля микроорганизмов, в процентах, которая задерживается в опыте (при фильтрации суспензии тест-микроорганизмов через мембранный фильтр с предфильтром) по сравнению с контролем (при фильтрации той же суспензии тест-микроорганизмов через мембранный фильтр без предфильтра или при определении числа микроорганизмов в суспензии методом прямого посева). Величина MRF может быть рассчитана из величины \bar{R} , найденной через $\lg R_i$ из соотношения (4), по формуле:

$$MRF\% = 100 \cdot [1 - (1/\bar{R})]. \quad (8)$$

Следует отметить, что говорить о статистически значимом факторе задержки (т.е., что величина MRF значимо отличается от нуля) можно только в том случае, если величина \bar{R} значимо отличается от единицы, т.е. ее доверительный интервал, рассчитанный по соотношению (6), не включает единицу. При выполнении этого условия, соотношение (8) характеризует средний фактор задержки с доверительными интервалами, которые определяются величинами R_{low} и R_{high} из соотношения (6).

Из соотношения (7) можно рассчитать предельный допустимый средний фактор задержки для методики контроля МБЧ ($maxMRF$), значимо не влияющий на принятие решений о пригодности методики контроля МБЧ в соответствии с ГФУ:

$$max MRF\% = 100 \cdot [1 - (1/\max \bar{R})] = 40.3\%. \quad (9)$$

2. Экспериментальная часть

Экспериментальные исследования, результаты которых обобщены в настоящей работе, проводились с 2001 года и были закончены в 2003 году в рамках выполнения договора «Сравнительное изучение методов оценки микробиологической чистоты лекарственных средств» с Государственным фармакологическим центром.

Целью данных исследований было выяснение принципиальной возможности использования предфильтров в качестве подходящего предварительного способа отделения нерастворимых частиц для испытания микро-

биологической чистоты, при условии, что разработанная методика контроля МБЧ отвечает требованиям раздела «Ростовые свойства питательных сред и проверка пригодности методик испытаний» [1]. В качестве предфильтров использовали адсорбционные подложки, входящие в комплект мембранных фильтров производства фирмы «Миллипор» (номер по каталогу НАЕР 047 AW).

В экспериментальных исследованиях использовали следующие тест-микроорганизмы: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Candida albicans* ATCC 885-6532, *Aspergillus niger* ВКПГf-156/7813.

Для проведения исследований в фосфатном буферном растворе pH 7.0 готовили исходную суспензию монокультуры каждого из тест-микроорганизмов, содержащую от 10 КОЕ/мл до 100 КОЕ/мл. Рабочую суспензию монокультуры, содержащую от 1 КОЕ/мл до 10 КОЕ/мл, готовили путем десятикратного разведения исходной суспензии фосфатным буферным раствором pH 7.0. По 10 мл рабочей суспензии пропускали через мембранный фильтр с предфильтром (Ф + П) и мембранный фильтр без предфильтра (Ф). По окончании фильтрации мембранные фильтры помещали на поверхность соответствующей питательной среды. По 1 мл исходной суспензии высевали на чашки Петри с соответствующей питательной средой (ПП). Подробное описание методики проверки и схемы исследования приведено в предыдущих публикациях [6, 7].

Исследования проводили как для малых ($n = 4$), так и для сравнительно больших ($n > 4$) выборок, поскольку *a priori* необходимый размер выборки для проверки пригодности методики неизвестен.

Таким образом, при проверке пригодности предфильтров проводили определение числа КОЕ в суспензии монокультуры каждого из тест-микроорганизмов тремя методами: методом прямого посева (метод посева на чашки) (ПП), мембранной фильтрации (Ф) и мембранной фильтрации с предфильтром (Ф + П). Результаты, полученные с использованием предфильтров, оценивали по сравнению с результатами, полученными методом прямого посева и методом мембранной фильтрации без предфильтра. Пригодность методики проверялась также для фармакопейного метода мембранной фильтрации (без до-

Таблица 1

Результаты проверки пригодности методики определения числа КОЕ в рабочей суспензии для тест-микроорганизма *E. coli*

n	Число КОЕ на мембранном фильтре или чашке Петри			Величины R_i			Величины lgR_i		
	ПП	Ф	Ф + П	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)
1	61	85	42	0.72	1.45	2.02	-0.144	0.162	0.306
2	59	88	74	0.67	0.80	1.19	-0.174	-0.098	0.075
3	65	39	40	1.67	1.63	0.98	0.222	0.211	-0.011
4	35	34	29	1.03	1.21	1.17	0.013	0.082	0.069
5	73	70	58	1.04	1.26	1.21	0.018	0.100	0.082
6	70	71	82	0.99	0.85	0.87	-0.006	-0.069	-0.063
7	43	39	28	1.10	1.54	1.39	0.042	0.186	0.144
8	34	39	29	0.87	1.17	1.34	-0.060	0.069	0.129
9	37	38	31	0.97	1.19	1.23	-0.012	0.077	0.088
10	38	37	27	1.03	1.41	1.37	0.012	0.148	0.137
11	59	52	48	1.13	1.23	1.08	0.055	0.090	0.035
12	57	51	56	1.12	1.02	0.91	0.048	0.008	-0.041
13	72	33	31	2.18	2.32	1.06	0.339	0.366	0.027
среднее	54.1	52.0	44.2	1.12	1.31	1.22	0.03	0.10	0.08
$\overline{antilg(\lg R)} \leq 1.67$	-	-	-	-	-	-	1.06	1.27	1.19
min	34	33	27	0.67	0.80	0.87	-0.17	-0.10	-0.06
max	73	88	82	2.18	2.32	2.02	0.34	0.37	0.31
max/min	2.1	2.7	3.0	3.25	2.91	2.34	-	-	-
SD	14.7	19.8	18.4	0.40	0.39	0.29	0.13	0.12	0.10
$t(95\%,n-1)$	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18
Δ	32.1	43.1	40.0	0.87	0.85	0.64	0.29	0.26	0.21
$R_{low} \geq 0.2$	-	-	-	0.25	0.47	0.58	0.54	0.69	0.74
$R_{high} \leq 5.0$	-	-	-	1.99	2.16	1.86	2.09	2.32	1.92
Δ/\sqrt{n}	8.9	11.9	11.1	0.25	0.47	0.58	0.08	0.07	0.06
\overline{R}_{low}	-	-	-	0.88	1.08	1.04	0.88	1.07	1.04
\overline{R}_{high}	-	-	-	1.36	1.55	1.40	1.28	1.50	1.36
MRF% ≤ 40.3%							-	21.0	15.9

полнительных модификаций) по сравнению с фармакопейным методом прямого посева [1].

Для полученных результатов определения числа КОЕ в суспензии тест-микроорганизмов рассчитывали отношения (R_i) для каждого опыта по формуле (1). В качестве результатов контрольного опыта (К) использовали число КОЕ, определенное как методом прямого посева ПП (ПП/Ф, ПП/(Ф + П)), так и методом мембранной фильтрации (Ф/(Ф + П)), а в качестве результатов опыта — соответственно число КОЕ, определенное методом мембранной фильтрации Ф и методом мембранной фильтрации с пред-

фильтром Ф + П. Для всех результатов рассчитывали метрологические характеристики по соотношениям (1-8). Для сравнения, метрологические характеристики величин R_i рассчитывали как через lgR_i (соотношения (4-6)), так и обычным способом - непосредственно через величины R_i [4].

Результаты анализа и их метрологическая обработка представлены в Табл. 1-6.

3. Результаты и их обсуждение

Как видно из Табл. 1-6, число микроорганизмов в параллельных испытаниях, проведенных тремя методами (прямой посев (ПП), мембранная фильтрация (Ф), мембранная

Таблица 2

Результаты проверки пригодности методики определения числа КОЕ в рабочей суспензии для тест-микроорганизма *S. aureus*

n	Число КОЕ на мембранном фильтре или чашке Петри			Величины R_i			Величины lgR_i		
	ПП	Ф	Ф + П	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)
1	30	31	45	0.97	0.67	0.69	-0.014	-0.176	-0.162
2	83	101	71	0.82	1.17	1.42	-0.085	0.068	0.153
3	313	234	169	1.34	1.85	1.38	0.126	0.268	0.141
4	62	51	30	1.22	2.07	1.70	0.085	0.315	0.230
5	17	39	14	0.44	1.21	2.79	-0.361	0.084	0.445
6	56	61	35	0.92	1.60	1.74	-0.037	0.204	0.241
7	67	68	67	0.99	1.00	1.01	-0.006	0.000	0.006
8	43	36	33	1.19	1.30	1.09	0.077	0.115	0.038
9	67	75	62	0.89	1.08	1.21	-0.049	0.034	0.083
10	59	41	35	1.44	1.69	1.17	0.158	0.227	0.069
11	121	88	72	1.38	1.68	1.22	0.138	0.225	0.087
12	62	59	34	1.05	1.82	1.74	0.022	0.261	0.239
13	72	44	40	1.64	1.80	1.10	0.214	0.255	0.041
среднее	80.9	71.4	54.4	1.10	1.46	1.41	0.02	0.14	0.12
$antilg(lg R) \leq 1.67$	-	-	-	-	-	-	1.05	1.40	1.33
min	17	31	14	0.44	0.67	0.69	-0.36	-0.18	-0.16
max	313	234	169	1.64	2.07	2.79	0.21	0.32	0.44
max/min	18.4	7.5	12.1	3.75	3.10	4.04	-	-	-
SD	74.1	53.2	38.8	0.31	0.41	0.52	0.15	0.14	0.15
$t(95\%,n-1)$	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18
Δ	161.4	115.8	84.6	0.68	0.90	1.13	0.32	0.30	0.32
$R_{low} \geq 0.2$	-	-	-	0.41	0.56	0.28	0.50	0.69	0.64
$R_{high} \leq 5.0$	-	-	-	1.78	2.36	2.53	2.18	2.81	2.78
Δ/\sqrt{n}	44.8	32.1	23.5	0.19	0.25	0.31	0.09	0.08	0.09
\overline{R}_{low}	-	-	-	0.91	1.21	1.09	0.86	1.15	1.08
\overline{R}_{high}	-	-	-	1.29	1.71	1.72	1.28	1.69	1.63
MRF% $\leq 40.3\%$							-	28.3	24.8

фильтрация с предфильтрами (Ф + П)), характеризуется очень большой вариабельностью — отношение максимального значения к минимальному значению (*Max/Min*) колеблется от 2.1 (*E. Coli*, ПП) до 32.3 (*S. albicans*, ПП). Полуширины доверительных интервалов при этом изменяются от 32.1 (*E. Coli*, ПП) до 161.4 (*S. aureus*, ПП), захватывая и не имеющую физического смысла отрицательную область, т.е. при такой большой вариабельности результатов уже нельзя говорить о нормальном распределении. Данная вариабельность примерно одинакова для всех трех методов и сильно различается для различных культур микроорганизмов, достигая макси-

муму для *S. albicans*. Столь большие различия в параллельных опытах свидетельствуют о том, что их главной причиной является неопределенность приготовления исходной суспензии микроорганизмов.

Из значений *Max/Min* видно, что вариация величин R_i в целом гораздо меньше, чем для самих значений количеств микроорганизмов — величины *Max/Min* меняются от 1.45 (*P. aeruginosa*, Ф/(Ф + П)) до 4.04 (*S. aureus*, Ф/(Ф + П)). Отметим, что вариабельность величин R_i в отличие от результатов определения числа КОЕ, примерно одинакова для всех культур микроорганизмов и для всех трех отношений (ПП/Ф, ПП/(Ф + П), Ф/(Ф + П)).

Таблица 3

Результаты проверки пригодности методики определения числа КОЕ в рабочей суспензии для тест-микрорганализма *P. aeruginosa*

n	Число КОЕ на мембранном фильтре или чашке Петри			Величины R_i			Величины lgR_i		
	ПП	Ф	Ф + П	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)
1	28	41	33	0.68	0.85	1.24	-0.166	-0.071	0.094
2	14	12	10	1.17	1.40	1.20	0.067	0.146	0.079
3	14	7	7	2.00	2.00	1.00	0.301	0.301	0.000
4	45	58	40	0.78	1.13	1.45	-0.110	0.051	0.161
среднее	25.3	29.5	22.5	1.16	1.34	1.22	0.02	0.11	0.08
$antilog(\lg \bar{R}) \leq 1.67$	-	-	-	0.68	0.85	1.00	1.05	1.28	1.21
min	14	7	7	0.68	0.85	1.00	-0.17	-0.07	0.00
max	45	58	40	2.00	2.00	1.45	0.30	0.30	0.16
max/min	3.2	8.3	5.7	2.93	2.36	1.45	-	-	-
SD	14.7	24.2	16.5	0.60	0.49	0.18	0.21	0.16	0.07
$t(95\%, n-1)$	3.18	3.18	3.18	3.18	3.18	3.18	3.18	3.18	3.18
Δ	46.9	77.0	52.4	1.91	1.57	0.59	0.67	0.50	0.21
$R_{low} \geq 0.2$	-	-	-	-0.75	-0.22	0.64	0.23	0.40	0.75
$R_{high} \leq 5.0$	-	-	-	3.07	2.91	1.81	4.92	4.04	1.97
Δ/\sqrt{n}	13.0	21.4	14.5	0.95	0.78	0.29	0.19	0.14	0.06
\bar{R}_{low}	-	-	-	0.20	0.56	0.93	0.69	0.93	1.06
\bar{R}_{high}	-	-	-	2.11	2.13	1.52	1.62	1.76	1.39
MRF% ≤ 40.3%							-	-	17.5

Это подтверждает целесообразность и правомерность использования именно величин R_i при оценке результатов проверки пригодности методик.

Из Табл. 1-6 следует, что верхние границы доверительных интервалов для единичных значений R_i (значения R_{high}), рассчитанные через lgR_i (т.е. уравнения (4-6)), всегда несколько выше, чем рассчитанные непосредственно для величин R_i . В случае *P. aeruginosa* это различие является довольно заметным, что вызвано малым размером выборки ($n = 4$).

Существенно более высокими во всех случаях являются и нижние границы доверительных интервалов для единичных значений R_i (значения R_{low}), рассчитанные через lgR_i (т.е. уравнения (4-6)), по сравнению со значениями R_{low} , рассчитанными непосредственно для величин R_i . При этом средние значения \bar{R} , рассчитанные через lgR_i (величины $antilog(\lg \bar{R})$), всегда несколько меньше величин \bar{R} , рассчитанных непосредственно из R_i . Как видно из Табл. 3, для малых выборок ($n = 4$) при прямой статистической обработке величин R_i (без логарифмирования) мож-

но получить не имеющие физического смысла отрицательные значения нижней границы доверительного интервала (R_{low}). Это связано, в основном, с большим значением коэффициента Стьюдента ($t_{95\%, n-1} = 3.18$). Поскольку случай малых выборок является наиболее практически значимым, данные результаты подтверждают корректность статистической обработки результатов не через сами величины R_i , а через их логарифмы, т.е. соотношения (4-6).

Из Табл. 1-6 видно, что при расчетах через величины lgR_i верхней (R_{high}) и нижней (R_{low}) границ доверительных интервалов во всех случаях выполняются соотношения (5). Т.е., с точки зрения ГФУ [1], подтверждается пригодность методики как для метода мембранной фильтрации (Ф) по сравнению с методом прямого посева (ПП) (что неудивительно, поскольку оба метода являются фармакопейными [1]), так и для методики (Ф + П) с использованием в качестве префильтра адсорбционных подложек, входящих в комплект мембранных фильтров НАЕР 047 АW, производства фирмы «Millipore». При этом методика

Таблица 4

Результаты проверки пригодности методики определения числа КОЕ в рабочей суспензии для тест-микроорганизма *B. cereus*

<i>n</i>	Число КОЕ на мембранном фильтре или чашке Петри			Величины R_i			Величины IgR_i		
	ПП	Ф	Ф + П	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)
1	19	19	15	1.00	1.27	1.27	0.000	0.103	0.103
2	87	54	36	1.61	2.42	1.50	0.207	0.383	0.176
3	35	29	29	1.21	1.21	1.00	0.082	0.082	0.000
4	55	51	41	1.08	1.34	1.24	0.033	0.128	0.095
5	17	18	19	0.94	0.89	0.95	-0.025	-0.048	-0.023
6	47	57	38	0.82	1.24	1.50	-0.084	0.092	0.176
7	55	62	36	0.89	1.53	1.72	-0.052	0.184	0.236
8	16	14	13	1.14	1.23	1.08	0.058	0.090	0.032
9	29	21	19	1.38	1.53	1.11	0.140	0.184	0.043
10	30	26	19	1.15	1.58	1.37	0.062	0.198	0.136
11	85	87	72	0.98	1.18	1.21	-0.010	0.072	0.082
12	38	54	54	0.70	0.70	1.00	-0.153	-0.153	0.000
среднее	42.8	41.0	32.6	1.08	1.34	1.24	0.02	0.11	0.09
<i>antilg(lg R) ≤ 1.67</i>	-	-	-	-	-	-	1.05	1.29	1.22
min	17	31	14	0.70	0.70	0.95	-0.15	-0.15	-0.02
max	121	101	72	1.61	2.42	1.72	0.21	0.38	0.24
max/min	7.1	3.3	5.1	2.29	3.43	1.82	-	-	-
<i>SD</i>	24.2	22.9	17.6	0.25	0.42	0.24	0.10	0.13	0.08
<i>t(95%, n-1)</i>	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20
<i>Δ</i>	53.2	50.4	38.7	0.55	0.93	0.53	0.22	0.29	0.18
$R_{low} ≥ 0.2$	-	-	-	0.53	0.41	0.72	0.64	0.66	0.81
$R_{high} ≤ 5.0$	-	-	-	1.62	2.27	1.77	1.73	2.51	1.85
$Δ/\sqrt{n}$	14.8	14.0	10.7	0.16	0.27	0.15	0.06	0.08	0.05
\bar{R}_{low}	-	-	-	0.92	1.07	1.09	0.92	1.07	1.09
\bar{R}_{high}	-	-	-	1.23	1.61	1.40	1.21	1.55	1.37
MRF% ≤ 40.3%							-	22.3	18.3

с использованием предфильтра является корректной как по сравнению с методом мембранной фильтрации ($\Phi/(\Phi + \Pi)$), так и по сравнению с методом прямого посева ($\Pi\Pi/(\Phi + \Pi)$).

Следует отметить, что для получения статистически обоснованных результатов проверки пригодности методики в данном случае достаточно было и малой выборки из 4 параллельных опытов – для *P. aeruginosa*. При проведении исследования пригодности методики целесообразно и начинать с числа параллельных опытов $n = 4$ (для $n = 3$ коэффициент Стьюдента слишком велик – $t(95\%, 2) = 4.30$), увеличивая затем n , если условия (5) не выполняются. С другой стороны, увеличение

числа параллельных опытов выше $n = 10$ вряд ли целесообразно, поскольку не приводит к значимому уменьшению доверительных интервалов из-за близости коэффициента Стьюдента ($t(95\%, 9) = 2.26$) к предельному значению 1.96.

Из сравнения полученных величин $\overline{antilg(lg R)}$ видно, что они во всех случаях не превосходят критическое значение 1.67. Таким образом, все методики определения числа КОЕ в суспензии тест-микроорганизмов – как с использованием метода мембранной фильтрации с предфильтром, так и с использованием метода мембранной фильтрации без дополнительных модификаций или метода прямого посева не имеют значимой систе-

Таблица 5

Результаты проверки пригодности методики определения числа КОЕ в рабочей суспензии для тест-микроорганизма *S. albicans*

n	Число КОЕ на мембранном фильтре или чашке Петри			Величины R_i			Величины lgR_i		
	ПП	Ф	Ф + П	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)
1	4	4	4	1.00	1.00	1.00	0.000	0.000	0.000
2	26	23	17	1.13	1.53	1.35	0.053	0.185	0.131
3	55	50	23	1.10	2.39	2.17	0.041	0.379	0.337
4	55	62	35	0.89	1.57	1.77	-0.052	0.196	0.248
5	34	25	28	1.36	1.21	0.89	0.134	0.084	-0.049
6	12	9	10	1.33	1.20	0.90	0.125	0.079	-0.046
7	70	66	54	1.06	1.30	1.22	0.026	0.113	0.087
8	129	120	100	1.08	1.29	1.20	0.031	0.111	0.079
9	56	61	45	0.92	1.24	1.36	-0.037	0.095	0.132
10	27	39	33	0.69	0.82	1.18	-0.160	-0.087	0.073
11	129	120	100	1.08	1.29	1.20	0.031	0.111	0.079
12	31	22	23	1.41	1.35	0.96	0.149	0.130	-0.019
среднее	52.3	50.1	39.3	1.09	1.35	1.27	0.03	0.12	0.09
$antilg(lg R) \leq 1.67$	-	-	-	-	-	-	1.07	1.31	1.22
min	4	4	4	0.69	0.82	0.89	-0.16	-0.09	-0.05
max	129	120	100	1.41	2.39	2.17	0.15	0.38	0.34
max/min	32.3	30.0	25.0	2.04	2.92	2.43	-	-	-
<i>SD</i>	40.7	38.6	31.5	0.21	0.39	0.38	0.09	0.11	0.12
$t(95\%,n-1)$	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20
Δ	89.5	84.9	69.4	0.46	0.85	0.83	0.19	0.25	0.26
$R_{low} \geq 0.2$	-	-	-	0.63	0.50	0.44	0.69	0.74	0.68
$R_{high} \leq 5.0$	-	-	-	1.54	2.20	2.09	1.66	2.30	2.20
Δ/\sqrt{n}	24.8	23.6	19.2	0.13	0.24	0.24	0.05	0.07	0.07
\bar{R}_{low}	-	-	-	0.95	1.10	1.03	0.95	1.12	1.04
\bar{R}_{high}	-	-	-	1.22	1.59	1.51	1.21	1.53	1.44
MRF% ≤ 40.3%							-	23.5	18.3

матической погрешности, которая может влиять на принятие решений о пригодности методики в соответствии с ГФУ.

Значительный интерес представляют также факторы задержки микроорганизмов (*MRF*). Как видно из Табл. 1-6, как и следовало ожидать, фармакопейный метод мембранной фильтрации (Ф) не имеет статистически значимого фактора задержки по сравнению с методом прямого посева (ПП) — для него доверительные интервалы величин \bar{R} во всех случаях включают единицу. В случае же мембранной фильтрации с предфильтрами (Ф + П) во всех случаях (кроме *P. aeruginosa*, ПП/(Ф + П), где $R_{low} = 0.93$, что связано с малой выборкой и, соответственно, большим коэффициентом Стьюдента $t(95\%, 3) =$

3.18), значения \bar{R} значимо (на уровне 95 %) отличаются от единицы. Поэтому для данного метода (Ф + П) можно говорить о статистически значимом факторе задержки (*MRF*) — как по сравнению с методом прямого посева ПП (*MRF* = (21.0 – 28.3) %), так и по сравнению с методом мембранной фильтрации Ф (*MRF* = (15.9 – 24.8) %).

Таким образом, во всех случаях использования метода мембранной фильтрации с предфильтром (адсорбционные подложки) приходится считаться с наличием значимого фактора задержки в пределах (15-30) %. Однако (Табл. 1-6) фактор задержки во всех случаях не превышает критического значения 40.3 %. Учитывая, что и величины R_{low} и R_{high} во всех случаях (и, как правило, с очень боль-

Таблица 6

Результаты проверки пригодности методики определения числа КОЕ в рабочей суспензии для тест-микроорганизма *A. niger*

<i>n</i>	Число КОЕ на мембранном фильтре или чашке Петри			Величины R_i			Величины lgR_i		
	ПП	Ф	Ф + П	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)	ПП/Ф	ПП/(Ф+П)	Ф/(Ф+П)
1	28	26	14	1.08	2.00	1.86	0.032	0.301	0.269
2	13	12	8	1.08	1.63	1.50	0.035	0.211	0.176
3	16	9	10	1.78	1.60	0.90	0.250	0.204	-0.046
4	120	130	90	0.92	1.33	1.44	-0.035	0.125	0.160
5	28	34	26	0.82	1.08	1.31	-0.084	0.032	0.117
6	14	15	11	0.93	1.27	1.36	-0.030	0.105	0.135
7	120	125	90	0.96	1.33	1.39	-0.018	0.125	0.143
8	14	14	16	1.00	0.88	0.88	0.000	-0.058	-0.058
среднее	44.1	45.6	33.1	1.07	1.39	1.33	0.02	0.13	0.11
$antilg(\lg R) \leq 1.67$	-	-	-	-	-	-	1.04	1.35	1.29
min	13	9	8	0.82	0.88	0.88	-0.08	-0.06	-0.06
max	120	130	90	1.78	2.00	1.86	0.25	0.30	0.27
max/min	9.2	14.4	11.3	2.16	2.29	2.12	-	-	-
<i>SD</i>	47.2	51.2	35.5	0.30	0.35	0.32	0.10	0.11	0.11
$t(95\%,n-1)$	2.37	2.37	2.37	2.37	2.37	2.37	2.37	2.37	2.37
Δ	111.7	121.1	84.0	0.70	0.83	0.76	0.24	0.26	0.26
$R_{low} \geq 0.2$	-	-	-	0.37	0.56	0.57	0.60	0.74	0.71
$R_{high} \leq 5.0$	-	-	-	1.78	2.22	2.09	1.81	2.48	2.37
Δ/\sqrt{n}	31.0	33.6	23.3	0.25	0.29	0.27	0.07	0.07	0.07
\bar{R}_{low}	-	-	-	0.82	1.10	1.06	0.90	1.14	1.09
\bar{R}_{high}	-	-	-	1.32	1.68	1.60	1.22	1.60	1.53
MRF% ≤ 40.3%							-	26.0	22.7

шим запасом) удовлетворяют соотношению (5), можно сделать вывод, что метод мембранной фильтрации с использованием в качестве предфильтра адсорбционных подложек, входящих в комплект мембранных фильтров НАЕР 047 АW производства фирмы «Millipore», удовлетворяет критерию пригодности методик испытания МБЧ, приведенному в ГФУ [1].

Следовательно, само по себе использование метода мембранной фильтрации с предфильтром не может привести к тому, что методика, разработанная с использованием данного метода, не будет соответствовать критериям пригодности, приведенным в ГФУ. Решение о пригодности каждой индивидуальной методики испытания МБЧ необходимо принимать на основании результатов, полученных при экспериментальной проверке пригодности этой индивидуальной методики. Отметим, что это есть безусловным требованием Государственной Фармакопеи Украи-

ны. Для проверки пригодности мы рекомендуем использовать схемы исследования, опубликованные ранее [6, 8], и предложенные в настоящей публикации методы статистической оценки полученных экспериментальных результатов.

Выводы

1. Предложен статистически обоснованный подход к проверке пригодности методик контроля микробиологической чистоты в соответствии с требованиями ГФУ.

2. Проведена экспериментальная проверка его применимости на примере проверки пригодности метода мембранной фильтрации с предфильтром для контроля микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств.

3. Показано, что метод мембранной фильтрации с использованием в качестве предфильтра адсорбционных подложек, входящих в комплект мембранных фильтров НАЕР

047 AW производства фирмы «Millipore», удовлетворяет требованиям ГФУ к пригодности методики и может быть использован для контроля микробиологической чистоты лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – С. 111-115.
2. Жерноклев В.Н., Тысячная О.В., Герасимчук Т.В. Изучение правильности метода определения микробиологической чистоты при помощи мембранной фильтрации с использованием префильтров // Фарматека. – 2002. - № 4. – С. 65-69.
3. Варченко В., Герасимчук Т., Жерноклев В., Тысячная О. Биологические методы фармакопейного анализа в Украине должны соответствовать требованиям ЕС // Вісник фармакології і фармації. – 2003. - № 7-8. – С. 39-44.
4. Проект загальної статті Державної Фармакопеї України «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» // Фармаком. - № 1. – 2003. – С. 19-49.
5. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Доценко Т.Н., Денисенко Н.В. Критерии для параметров линейной зависимости при проведении валидации аналитических методик по ГФУ // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки і практики: Зб. наук. статей. – Запоріжжя: Видавництво ЗДМУ, 2003. - Випуск X. - С. 30-32.
6. Жемерова Е.Г., Кобзарь А.И., Хованская Н.П. К вопросу контроля микробиологической чистоты лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. Сообщение 1. Проверка пригодности методик определения общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов // Фармаком. – 2002. - № 3. – С. 51-55.
7. Жемерова Е.Г., Деркач Н.З., Дунай Е.В., Литкевич С.А., Мирошниченко А.П., Шермухамедова О.Г., Поддубная Т.Л. Изучение пригодности метода мембранной фильтрации с использованием префильтра для контроля микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств // Фармаком. – 2002. - № 4. – С. 22-30.
8. Жемерова Е.Г., Хованская Н.П. К вопросу контроля микробиологической чистоты лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. Сообщение 2. Проверка пригодности методик испытания на отдельные виды микроорганизмов // Фармаком. – 2003. - № 1. – С. 4-15.

Резюме

Жемерова К.Г., Дунай О.В., Шермухамедова О.Г., Підпружников Ю.В., Гризодуб О.І., Георгієвський В.П.

Фармакопейні аспекти перевірки придатності методик контролю микробиологічної чистоти лікарських засобів

Запропоновано статистично обґрунтований підхід до перевірки придатності методик контролю микробиологічної чистоти відповідно до вимог ДФУ. Проведена експериментальна перевірка його застосовності на прикладі перевірки придатності методу мембранної фільтрації з префільтром для контролю микробиологічної чистоти нестерильних лікарських засобів. Показано, що метод мембранної фільтрації з використанням адсорбційних підкладок, що входять у комплект мембранних фільтрів НАЕР 047 AW виробництва фірми «Millipore» як префільтра, задовольняє вимогам ДФУ до придатності методики і може бути застосований для контролю микробиологічної чистоти лікарських засобів.

Summary

Жемерова Е.Г., Дунай Е.В., Шермухамедова О.Г., Подпружников Ю.В., Гризодуб А.И., Георгиевский В.П.

Pharmacopoeial aspects of drug microbiological purity control procedure suitability testing

A statistically substantiated approach to suitability testing of microbiological purity control procedures in accordance with the Ukrainian State Pharmacopoeia requirements has been developed. An experimental verification of its applicability on the example of suitability testing of membrane filtration method with a pre-filter for microbiological purity control of non-sterile medications has been performed. It was shown that the membrane filtration method using the adsorption substrates included in the set of НАЕР 047 AW membrane filters manufactured by Millipore Company as a pre-filter complies with the Ukrainian State Pharmacopoeia requirements for the procedure suitability and may be used for microbiological control of medications.

Жемерова Екатерина Георгиевна. Окончила Харьковский государственный университет (1985). Работает в ГП ГНЦАС (с 1989). И.о. зав. лабораторией микробиологических исследований ГП ГНЦАС (2002). Вед. науч. сотр. лаборатории фармаанализа ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр».

Дунай Елена Вячеславовна. Окончила Харьковский государственный университет (1996). Работает в ГНЦАС (с 1996). М.н.с. лаборатории микробиологических исследований ГНЦАС.

Шермухамедова Оксана Геннадьевна. Окончила Харьковский государственный университет (1990). Работает в ГП ГНЦАС (с 1994). М.н.с. лаборатории микробиологических исследований ГП ГНЦАС и лаборатории фармаанализа ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр».

Подпружников Юрий Васильевич (р.1963). Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1985). Д.фарм.н. (1996). Начальник управления инспектората по надлежущей производственной, дистрибуторской практике, контролю соблюдения лицензионных условий.

Гризодуб Александр Иванович (р. 1948). Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1971). Зав. лабораторией хроматографии ГП ГНЦАС. Зам. директора ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» по научной работе (1992). Д.х.н. (1990). Профессор (1996). Действительный член Нью-Йоркской Академии Наук (1994). Член Международной ассоциации официальных аналитических химиков (1997).

Георгиевский Виктор Петрович (р. 1937). Окончил фармацевтическое отделение 1-го Московского медицинского института (1959). Работает в ГП ГНЦАС (с 1958). Д.фарм.н. (1980). Чл.-корр. НАН Украины (2003). Директор ГП ГНЦАС. Директор ГП НЭФЦ. Председатель Редакционной коллегии Государственной Фармакопеи Украины.

УДК 543.422.3-76

Гриздуб А.И., Зволинская Н.Н., Архипова Н.Н.,
Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Доценко Т.Н.

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»
Государственная инспекция по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины

Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях

В рамках 3 раунда Программы профессионального тестирования лабораторий «Фарма – тест» в системе Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины (ППТ) впервые для отечественных лабораторий проведен анализ метрологических характеристик метода спектрофотометрии при количественном определении 1 % спиртового раствора кислоты салициловой в межлабораторном эксперименте. Среднее относительное стандартное отклонение измерений оптической плотности с рандомизацией положения кюветы, полученное лабораториями-участницами 3 раунда ППТ, составило 0.52 %, что позволяет проводить количественное определение всех готовых лекарственных средств методом одноволновой спектрофотометрии в варианте метода стандарта. Данное значение, однако, вдвое превышает рекомендованное (0.25 %), что затрудняет применение многоволновых методик. Величину 0.52 % следует учитывать при валидации и прогнозе погрешности спектрофотометрического анализа в разных лабораториях. Расхождение в величинах удельных показателей поглощения кислоты салициловой в разных лабораториях достигало 11.8 %. Это ставит под сомнение возможность использования удельного показателя поглощения для расчета результатов количественного определения при контроле качества готовых лекарственных средств даже с допусками содержания ± 10 % без введения в АНД дополнительного контроля оптической плотности по калия дихромату. Главной причиной такого расхождения является приборный фактор. Основной вклад в полную неопределенность анализа вносит неопределенность пробоподготовки, которая в несколько раз превышает как теоретически допустимые значения, так и неопределенность собственно спектрофотометрического измерения. Возможными причинами этого могут быть: неудовлетворительное состояние весов, использование некалиброванных мерных колб и пипеток и, в особенности, субъективный фактор. Полученные в разных лабораториях значения содержания кислоты салициловой характеризуются доверительным интервалом 3.7 %, что превышает предельно допустимую величину (3.2 %) для данного анализа. Столь значительная неопределенность, связанная, в значительной степени, с некорректным выполнением спектрофотометрических измерений, объясняет большое количество неудовлетворительных результатов анализа кислоты салициловой в 3 раунде ППТ.

Важным вопросом практического применения фармакопейного спектрофотометрического анализа [1] является воспроизводимость методик количественного определения лекарственных средств (ЛС) в разных лабораториях. Такие исследования осложнены необходимостью проведения обширных межлабораторных испытаний. Хорошую возможность для таких исследований представляет Программа профессионального тестирования лабораторий (ППТ) в системе Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины [2, 8]. Разработанные принципы ППТ и формы отчетов, предоставляемых лабораториями-участницами [2], а также большое число участников (более 50) позволяют проводить достаточно многостороннюю оценку метрологических характеристик этих лабораторий и всей отечественной (подавляющее большинство участников 3-го раунда ППТ – отечественные лаборатории) системы контроля качества ЛС в целом.

Основные метрологические вопросы, которые интересовали нас в данном случае в этих межлабораторных исследованиях, следующие.

1. Современные спектрофотометры позволяют получать сходимость оптической плотности (с учетом кюветной невоспроизводимости) $RSD_{spectr} \leq 0.1$ %. Данная величина является очень важной при оценке (прогнозе) неопределенности спектрофотометрических методик количественного определения и их валидации [1, 3]. В то же время, в отличие от хроматографических методов, в спектрофотометрическом анализе не проводится проверка пригодности системы (в частности, значений RSD_{spectr}) [1]. Поскольку межлабораторные исследования воспроизводимости нефармакопейных методик АНД не проводятся (в силу, прежде всего, конфиденциальности АНД), единственным способом оценить эту воспроизводимость является прогноз неопределенности, для чего необходимо знать реальные величины RSD_{spectr} в других лабораториях. Каковы реальные значения RSD_{spectr} в отечественных лабораториях?

2. Точность методик анализа ЛС должна быть адекватна допускам содержания анализируемых компонентов [4]. Какова реальная точность количественного спектрофотометрического анализа в отечественных лабораториях, какие задачи она позволяет решать?

3. В некоторых спектрофотометрических методиках, включенных в регистрационные досье, используется метод удельного показателя поглощения. Исследования воспроизводимости удельного показателя поглощения калия дихромата при длинах волн 235 нм, 257 нм, 313 нм, 350 нм и 430 нм, проведенные Европейской Фармакопеей (ЕФ) среди 13 национальных аккредитованных лабораторий [5], показали, что относительное стандартное отклонение (*RSD*) этой величины, соответственно, составляет 0.56 % (235 нм), 0.44 % (257 нм), 1.28 % (313 нм), 0.61 % (350 нм) и 0.87 % (430 нм). Используя приведенные в ЕФ и ГФУ [1] значения удельных показателей поглощения калия дихромата и его номинальную концентрацию в растворе (0.006 %), можно показать, что с вероятностью 99.5 % данные *RSD* соответствуют абсолютной неопределенности оптической плотности около 0.01 ед. Эта абсолютная неопределенность оптической плотности соответствует абсолютным допускам удельных показателей поглощения калия дихромата (1.6-1.7 ед.), приведенным в ЕФ и ГФУ [1]. В этом случае пробоподготовка была минимальной (навеску растворяли в мерной колбе вместимостью 1000 мл). В реальных условиях спектрофотометрического анализа ЛС делается обычно, как минимум, еще одно разведение (с использованием пипетки малого объема). Какова воспроизводимость удельного показателя поглощения в различных отечественных лабораториях в этом случае, позволяет ли она использовать этот метод при контроле качества лекарственных средств?

4. Общая неопределенность методики количественного определения включает неопределенность конечной аналитической операции (измерение оптической плотности) Δ_{FAO} и неопределенность пробоподготовки Δ_{SP} [3, 4]. Величина Δ_{FAO} характеризует уровень спектрофотометров и корректность процедуры измерения оптической плотности. Величина Δ_{SP} отражает как класс используемой мерной посуды, так и квалификацию персонала. Как видно, обе величины (Δ_{FAO} и Δ_{SP}) подвержены значительному влиянию субъективных факторов, роль которых, как показывают исследования других методов [6], может быть очень значительной. В случае спектрофотометрии, характеризующейся, по сравнению с ВЭЖХ и титрованием, самой сложной пробоподготовкой, субъективные факторы при проведении ППТ приводят к самым большим (по сравнению с ВЭЖХ и титрованием)

погрешностям анализа [2, 7, 8]. Каково взаимоотношение между величинами Δ_{FAO} и Δ_{SP} в случае спектрофотометрии?

Выяснение этих вопросов и являлось целью данной статьи. Данная работа проводилась в рамках 3 раунда (ППТ) лабораторий в системе Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств [2, 7]. Следует отметить, что подобные обширные исследования спектрофотометрического анализа для отечественных лабораторий еще не проводились. Нет также данных и о выделении различных видов неопределенности спектрофотометрического анализа (конечная аналитическая операция и пробоподготовка) в межлабораторных исследованиях.

При проведении данных исследований мы сознательно не затрагивали оценку работы лабораторий-участниц ППТ, поскольку эти вопросы уже были подробно освещены организаторами 3 раунда ППТ [2].

1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве тестового образца был взят 1 % раствор кислоты салициловой (КС) в 96 % спирте, использующийся в качестве ЛС [2, 7], который анализировали прямой спектрофотометрией при длине волны 236 нм. В качестве стандартного образца использовали ФСО ГФУ КС, которые были предоставлены лабораториям-участницам вместе с тестовыми образцами. Вопросы аттестации тестовых образцов были обсуждены ранее [2].

Определение содержания КС в лабораториях-участницах проводилось на трех аликвотах тестового образца и трех навесках ФСО ГФУ. Вопросы аттестации тестовых образцов кислоты салициловой нами подробно рассмотрены ранее [9]. Все использованные реактивы соответствовали требованиям ГФУ.

Далее, если специально не оговорено, будут предполагаться относительные доверительные интервалы (Δ), в процентах к среднему значению, для вероятности 95 % [10].

1.1 Методика определения содержания кислоты салициловой в тестовом образце КС [2, 8]

Раствор образца: 5.0 мл тестового образца КС помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл (*V*) и доводили 96 % спиртом до метки. 2.0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 0.5 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной и доводили 96 % спиртом до метки. Готовили три параллельных разведения.

Раствор стандарта: около 0.05 г (точная навеска m_{st}) ФСО ГФУ КС помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили 96 % спиртом до метки. 2.0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 0.5 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной и доводили 96 % спиртом до метки. Готовили три параллельных разведения.

Сразу после приготовления измеряли оптические плотности полученных растворов образца и стандарта при длине волны 236 нм относительно раствора, полученного разведением 0.5 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной до 100 мл 96 % спиртом. Получали по три значения оптической плотности (A_{ij}) для каждого из трех растворов образца и по три значения оптической плотности ($A_{ij}(st)$) для каждого из трех растворов стандарта. При каждом измерении кювету вынимали, раствор выливали и наливали новый (т.е. проводили измерения оптической плотности с рандомизацией положения кюветы [11]).

Рассчитывали среднее значение оптической плотности для каждого раствора образца (A_j) и каждого раствора стандарта ($A_j(st)$), а также среднее значение оптической плотности (\bar{A}) образца по всем трем растворам. Для каждого (i) раствора образца и стандарта рассчитывали величины:

$$R_i = \frac{V_{b1,i}}{v_{p1,i}} \cdot \frac{V_{b2,i}}{v_{p2,i}} \cdot \sum_{j=1}^n \frac{A_{ij}}{n} = 1000 \cdot \sum_{j=1}^3 \frac{A_{ij}}{3},$$

$$A_{1cm,i}^{1\%} = R_{st,i} = \frac{10 \cdot V_{b1,st,i}}{m_{st,i}} \cdot \frac{V_{b2,st,i}}{v_{p2,st,i}} \cdot \sum_{j=1}^n \frac{A_{st,ij}}{n} =$$

$$= \frac{50000}{m_{st,i}} \cdot \sum_{j=1}^3 \frac{A_{st,ij}}{3},$$

где:

$V_{b1,i} = V_{b2,i} = V_{b1,st,i} = V_{b2,st,i} = 100$ мл — объем мерных колб, использованных для приготовления образца и стандарта;

$v_{p1,i} = 5$ мл — объем пипетки, использованный для первого разведения тестового образца;

$v_{p1,i} = v_{p2,i} = v_{p2,st,ij} = 2$ мл — объем пипетки, использованный для второго разведения;

индексы объемов пипеток и мерных колб введены для того, чтобы показать, что эти пипетки и мерные колбы имеют одинаковый номинальный, но разный фактический (в пределах допусков погрешности мерной посуды) объем;

$m_{st,i}$ — навески ФСО (около 50 мг);

$n = 3$ — количество параллельных измерений оптической плотности для каждого раствора образца и стандарта;

A_{ij} — оптическая плотность в j -ом параллельном измерении раствора образца, полученного из i -ой пробы по 5 мл;

$A_{st,ij}$ — оптическая плотность в j -ом параллельном измерении раствора стандарта, полученного из i -ой навески.

$A_{1cm,i}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения КС, рассчитанный из i -ой навески.

Величина R представляет собой нормированную оптическую плотность, соответствующую оптической плотности неразведенного тестового образца.

Содержание КС (X), в процентах к номинальному содержанию, рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{\frac{1}{k} \sum_{i=1}^{i=k} R_i}{\frac{1}{k} \sum_{i=1}^{i=k} R_{i,st}} \cdot X_{st} = \frac{\bar{R}}{\bar{R}_{st}} \cdot X_{st}, \quad (2)$$

где:

X_{st} — содержание КС в ФСО ГФУ КС, в процентах;

k — количество навесок (растворов) образца и стандарта (в нашем случае $k = 3$).

Из соотношения (1) видно, что количественное содержание (X) представляет собой отношение двух находимых экспериментально независимых величин \bar{R} и \bar{R}_{st} . Поэтому неопределенность величины X может находиться только расчетным путем — как функция нескольких случайных переменных [10]. При этом могут использоваться различные подходы (например, линейная модель и модель Уэлча-Сатертуэйта), которые могут приводить к несколько различающимся результатам [10]. В противовес этому неопределенность самих величин R и R_{st} находится непосредственно из экспериментальных данных без каких-либо дополнительных допущений. Это делает использование этих величин более объективным и удобным для анализа факторов, влияющих на воспроизводимость методик спектрофотометрии в разных лабораториях.

1.2. Данные, представленные лабораториями-участницами ППТ

В 3 раунде ППТ анализ тестового образца КС проводили 55 лабораторий [2]. Они пре-

доставляли организаторам ППТ, в частности, следующие данные:

1. Значения оптических плотностей для параллельных (j) измерений (с рандомизацией положения кюветы) каждого (i) раствора образца и стандарта (A_{ij} и $A_{st,ij}$).

2. Средние значения оптических плотностей для каждого (i) раствора (A_i и $A_{st,i}$) и относительные стандартные отклонения (в процентах) единичного измерения оптической плотности с рандомизацией положения кюветы $RSD_{spectr,i}(sample)$ и $RSD_{spectr,i}(st)$.

3. Величины R_i и $R_{st,i}$ для каждого (i) раствора образца и стандарта, в соответствии с соотношением (1).

4. Средние значения \bar{R} и \bar{R}_{st} и относительные стандартные отклонения (в процентах) единичного результата $RSD_R(sample)$ и $RSD_R(st)$.

Такая схема представления данных, основанная на принципе прослеживаемости результатов, позволяла достаточно объективно и всесторонне оценить представленные данные [2].

2. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1. Статистическая обработка первичных метрологических характеристик результатов лабораторий-участниц

Цель статистической обработки исходных метрологических характеристик результатов – получить обобщенные по всем лабораториям-участницам метрологические характеристики неопределенности анализа.

При проведении статистической обработки мы применили подход, разработанный нами для обработки результатов определения линкомицина методом ВЭЖХ – с использованием нормированных значений аналитического сигнала (т.е. величин R) [12]. В данном случае, однако, число степеней свободы настолько велико (от 110 до 660 - см. ниже), что полученные величины RSD можно вполне считать генеральными и проводить анализ результатов непосредственно с ними, не используя доверительных интервалов, как в случае линкомицина [12]. Действительно, коэффициенты Стьюдента при этом меняются от 1.982 ($f=110$) до 1.964 ($f=660$) (при $f=\infty$ он равен 1.960), т.е. не более 1 %, что далеко от обычно принимаемого уровня значимости 5 % [4].

Каждому результату лаборатории присваивали ее индекс (t). По представленным данным рассчитывали следующие величины:

2.1.1. Объединенное относительное стандартное отклонение (RSD_{spectr}) параллельных измерений оптической плотности находили из соотношения [9-11]:

$$RSD_{spectr}^2 = \frac{1}{2g \cdot k} \cdot \sum_{i,t=1}^{k,g} [RSD_{spectr,ti}^2(sample) + RSD_{spectr,ti}^2(st)] =$$

$$= \frac{1}{2g} \cdot \sum_{t=1}^g [RSD_{spectr,t}^2(sample) + RSD_{spectr,t}^2(st)] = \frac{1}{2g} \cdot \sum_{t=1}^g RSD_{spectr,t}^2 =$$

$$= \frac{1}{2} \cdot [RSD_{spectr}^2(sample) + RSD_{spectr}^2(st)];$$

$$f_{spectr}(sample) = f_{spectr}(st) = g \cdot k \cdot (n-1) =$$

$$= 55 \cdot 3 \cdot (3-1) = 330;$$

$$f_{spectr} = f_{spectr}(sample) + f_{spectr}(st) = 660,$$

где:

$g = 55$ – количество лабораторий, участвовавших в ППТ,

$k = 3$ – количество навесок (растворов) тестового образца КС и ФСО КС,

$n = 3$ – количество параллельных измерений оптической плотности для каждого раствора.

Величины $RSD_{spectr}(sample)$ и $RSD_{spectr}(st)$ имеют по 330 степеней свободы, объединенное RSD_{spectr} имеет 660 степеней свободы.

2.1.2. Неопределенность конечной аналитической операции при определении величины R единичного раствора (среднее из трех параллельных измерений оптической плотности) характеризовали относительным стандартным отклонением RSD_{FAO} [9-11]:

$$RSD_{FAO} = \frac{RSD_{spectr}}{\sqrt{3}} \quad (4)$$

Величина RSD_{spectr} берется из соотношения (3).

2.1.3. Объединенное относительное стандартное отклонение для величины R (RSD_R) находили из соотношения [9-11]:

$$RSD_R^2 = \frac{1}{2g} \cdot \sum_{t=1}^g [RSD_{R,t}^2(sample) + RSD_{R,t}^2(st)] = \frac{1}{2g} \cdot \sum_{t=1}^g RSD_{R,t}^2 =$$

$$= \frac{1}{2} \cdot [RSD_R^2(sample) + RSD_R^2(st)];$$

$$\begin{aligned}
 f_R(\text{sample}) &= f_R(st) = g \cdot (k - 1) = \\
 &= 55 \cdot (3 - 1) = 110; \\
 f_R &= f_R(\text{sample}) + f_R(st) = 220.
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

Обозначения и индексы имеют здесь тот же смысл, что и в соотношении (3). Величины $RSD_R(\text{sample})$ и $RSD_R(st)$ имеют по 110 степеней свободы, объединенное RSD_R имеет 220 степеней свободы.

2.1.4. Средняя неопределенность результатов количественного определения лабораторий-участниц.

Из соотношений (2) и (5) можно рассчитать среднее внутрилабораторное относительное стандартное отклонение воспроизводимости результатов определения содержания КС (RSD_X) для лабораторий-участниц. Поскольку содержание X рассчитывается из величин \bar{R} и R_{st} , рассчитанных из $k = 3$ параллельных проб по 5 мл (образец) и навесок (стандарт), то, в соответствии с [9-11], она равна:

$$\begin{aligned}
 RSD_X &= \sqrt{\frac{RSD_R^2(\text{sample}) + RSD_R^2(st)}{k}}; \\
 f(X) &= g \cdot (k - 1) = 55 \cdot (3 - 1) = 110.
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

Как видно из (3) и (5), полученные метрологические характеристики характеризуются достаточно большими степенями свободы (от 110 до 660), что позволяет получить достаточно надежные выводы при их анализе.

Не следует, однако, думать, что величина RSD_X характеризует среднюю полную неопределенность величин X в лабораториях-участницах. Она характеризует лишь внутрилабораторную воспроизводимую результатов и не включает постоянную погрешность конкретной лаборатории.

Факторами этой постоянной погрешности могут быть:

1. Систематическое завышение/занижение результатов взвешивания.
2. Некорректная пробоподготовка.
3. Некорректная процедура измерения оптической плотности.

Несмотря на обязательную метрологическую поверку весов, первый фактор может быть очень значительным, поскольку ежедневный мониторинг весов (как того требует, например, Фармакопея США [13]) в отечественных лабораториях обычно не проводится. Данный вопрос требует отдельного рассмотрения, поскольку оценить данную неконтролируемую составляющую пока не

представляется возможным. В связи с этим, далее мы ее рассматривать не будем (т.е. будем считать ее равной нулю).

Значимость второго и третьего факторов систематической погрешности в конкретной лаборатории зависит от корректности реализации метода стандарта в конкретной лаборатории. Рассмотрим корректный и некорректный варианты.

Последовательность операций с испытуемым и стандартным растворами, в соответствии с описанной выше (п. 1.1) методикой, характеризуется схемой:

Испытуемый раствор: 5 мл/100 мл, 2мл/100 мл → измерение $A_{236 \text{ нм}}$.

Стандартный раствор: 50 мг/100 мл, 2мл/100 мл → измерение $A_{236 \text{ нм}}$.

Корректное применение метода стандарта состоит в том, что для второго разведения испытуемого и стандартного растворов используется *одна и та же пипетка* вместимостью 2 мл. В этом случае постоянная погрешность этой пипетки (в соответствии с [4, 14] она не должна превышать 0.5 %) нивелируется.

Измерение оптической плотности испытуемого и стандартного растворов должно проводиться в одной и той же кювете, одинаково расположенной, против одной и той же компенсационной кюветы. Это позволяет, при корректной технике измерения оптической плотности (раствор и отпечатки пальцев не должны попадать на измеряемые стенки кюветы) в значительной степени нивелировать кюветную разность, которая только за счет допустимого различия длины кюветы может достигать 1 % [1] измеряемой величины оптической плотности. На практике же при некорректном и неконтролируемом использовании кювет кюветная разность может достигать 0.10 единиц оптической плотности [15], что полностью обесценивает все получаемые результаты. К сожалению, в силу своей неконтролируемости, данная составляющая постоянной погрешности не поддается прогнозированию, поэтому далее ее рассматривать не будем (т.е. будем считать ее равной нулю).

Нетрудно видеть, что даже в случае корректного применения метода стандарта неопределенность пипетки 5 мл (в соответствии с [4, 14] она не должна превышать 0.6 %, что соответствует $RSD = 0.30$ %) остается некомпенсированной - параллельные разведения лишь рандомизируют случайную погрешность исполнителя, но не могут рандомизовать пас-

портную погрешность самой пипетки, которая выступает как постоянная погрешность данной лаборатории. Погрешность мерных колб и навесок при этом рандомизируется и является одной из составляющих величины RSD_X . С учетом вышесказанного, полное среднее относительное стандартное отклонение неопределенности величины X лабораторий ($RSD_X(tot)$), должно удовлетворять соотношению:

$$\begin{aligned} correct : RSD_X(tot) &\leq \sqrt{RSD_X^2 + 0.30^2} = \\ &= \sqrt{RSD_X^2 + 0.09}. \end{aligned} \quad (7)$$

Некорректное применение метода стандарта в нашем случае состоит в том, что для второго разведения испытуемого и стандартного растворов используются *различные пипетки* вместимостью 2 мл. В этом случае неопределенности пипеток для испытуемого и стандартного растворов (в соответствии с [4, 14] они не должны превышать 0.5 % каждая, что соответствует относительному стандартному отклонению 0.25 %) суммируются и выступают как постоянная погрешность данной лаборатории. Отметим, что данные оценки верны, если мерная посуда соответствует требованиям ЕФ [4, 14]. Однако лаборатории могут использовать посуду 2 класса, для которой неопределенность пипеток вместимостью 2 мл и 5 мл может достигать 1.0 % [16], что соответствует $RSD = 0.50\%$. Оценим этот худший случай. С учетом соотношений (6-7), получим:

$$\begin{aligned} worst : RSD_X(tot) &\leq \\ &\leq \sqrt{RSD_X^2 + 0.30^2 + 0.50^2 + 0.50^2} = \\ &= \sqrt{RSD_X^2 + 0.59} \end{aligned} \quad (8)$$

Экспериментально величину $RSD_X(tot)$ можно оценить как относительное стандартное отклонение величин X 55 лабораторий-участниц 3 раунда ППТ (число степеней свободы $55-1 = 54$). Полученное $RSD_X(exp)$ не должно значимо быть выше величины из соотношения (8), т.е., учитывая (6):

$$\frac{RSD_X^2(exp)}{RSD_X^2(tot)} \leq F[0.95, 54, 110] = 1.454. \quad (9.1)$$

$$\frac{RSD_X^2(exp)}{RSD_X^2(tot)} \leq F[0.99, 54, 110] = 1.697. \quad (9.2)$$

Невыполнение соотношений (9.1) или (9.2) говорит о наличии постоянных погрешностей

лабораторий, не учитываемых соотношениями (7-8), т.е. погрешности весов и некорректной процедуры измерения оптической плотности.

Отметим, что соотношения (7-8) учитывают только паспортные неопределенности мерной посуды и совершенно не учитывают субъективный фактор — квалификацию аналитика, который проводит анализ. Предполагается, что данная случайная неопределенность (которая к тому же рандомизируется тремя параллельными разведениями) незначима по сравнению с паспортной неопределенностью (выступающей как постоянная неопределенность). Поэтому невыполнение соотношений (9.1-9.2) может свидетельствовать также о наличии субъективного фактора.

2.2. Воспроизводимость относительного стандартного отклонения (RSD_{sp}) сходимости параллельных измерений оптической плотности

При проведении аттестации тестового образца КС было получено относительное стандартное отклонение $RSD_{spectr}(Att) = 0.50\%$ параллельных измерений оптической плотности с числом степеней свободы $f_{spectr}(Att) = 29$ [9]. Для того, чтобы результаты аттестации тестовых образцов были сравнимы с результатами ППТ (т.е. проводились на оборудовании примерно одной точности), эта величина не должна значимо быть выше по критерию Фишера объединенного относительного стандартного отклонения (RSD_{spectr}) параллельных измерений оптической плотности лабораторий-участниц с числом степеней свободы $f_{spectr} = 660$ (см. соотношение (3)), т.е.:

$$\frac{RSD_{spectr}^2}{RSD_{spectr}^2(Att)} \leq F[0.95, 660, 29] = 1.649. \quad (10.1)$$

$$\frac{RSD_{spectr}^2}{RSD_{spectr}^2(Att)} \leq F[0.99, 660, 29] = 2.054. \quad (10.2)$$

2.3. Взаимосвязь фактического (RSD_{sp}) и теоретически максимально возможного ($max RSD_{sp}$) относительного стандартного отклонения пробоподготовки

Относительное стандартное отклонение величины R можно представить в виде [4, 10]:

$$RSD_R^2 = RSD_{FAO}^2 + RSD_{SP}^2, \quad (11)$$

где:

RSD_{FAO} — относительное стандартное отклонение конечной аналитической операции для величины R ,

RSD_{SP} – относительное стандартное отклонение пробоподготовки для величины R .

В отличие от RSD_{FAO} , фактическое (экспериментальное) относительное стандартное отклонение пробоподготовки не может быть найдено непосредственно из экспериментальных данных – оно может быть найдено только расчетным путем. Так, из уравнения (11) получим:

$$RSD_{SP} = \sqrt{RSD_R^2 - RSD_{FAO}^2}. \quad (12)$$

При этом величины RSD_R и RSD_{FAO} находят-ся из соотношений (5) и (4), соответственно.

Следует отметить, что соотношение (12) учитывает лишь случайную составляющую пробоподготовки, т.е. ту ее часть, которая рандомизируется схемой эксперимента. Сюда не включается постоянная составляющая (см. п. 2.1.4).

С другой стороны, максимально возможное (исходя из требований к посуде) относительное стандартное отклонение $max RSD_{SP}$ можно прогнозировать, исходя из требований к максимальной погрешности мерной посуды [4, 14]. При этом целесообразно вначале рассчитывать доверительный интервал [4], а потом из него $max RSD_{SP}$ – делением доверительного интервала на коэффициент Гаусса 1.96 (для 95 % вероятности), поскольку в данном случае предполагаются генеральные величины.

Отметим, что в отличие от ВЭЖХ-анализа линкомицина [12], в данном случае пробоподготовка испытуемого образца (5 мл/100 мл и 2 мл/100 мл) и стандарта (50 мг/100 мл и 2 мл/100 мл) различаются, что приводит и к несколько разным величинам $max RSD_{SP(sample)}$ и $max RSD_{SP(st)}$ [4, 10, 14]. Величина RSD_{SP} из соотношения (12) учитывает только рандомизируемую погрешность (т.е. та, которая статистически меняется в 3 параллельных разведениях). В данном случае это навеска (50 мг) и мерные колбы (100 мл). Паспортные неопределенности пипеток вместимостью 5 мл и 2 мл выступают при этом как постоянные погрешности, которые не могут быть нивелированы увеличением числа параллельных разведений, и не включаются в RSD_{SP} . Поэтому, в том случае, когда мерная посуда удовлетворяет фармакопейным требованиям [4, 10, 14], получим:

Мерная посуда удовлетворяет фармакопейным требованиям:

$$\begin{aligned} max \Delta_{SP}(st) &= \\ &= \sqrt{\left(\frac{100 \cdot 0.2}{50}\right)^2 + 0.12^2 + 0.12^2} = 0.44 \%, \\ max RSD_{SP}(st) &= max \Delta_{SP} / 1.96 = 0.22 \%. \\ max \Delta_{SP}(sample) &= \\ &= \sqrt{0.12^2 + 0.12^2} = 0.17 \%, \\ max RSD_{SP}(sample) &= \\ &= max \Delta_{SP} / 1.96 = 0.087 \%. \end{aligned} \quad (13)$$

где:

0.2 мг – максимальная допустимая абсолютная неопределенность взвешивания,
0.12 % – максимально допустимая относительная неопределенность объема мерной колбы вместимостью 100 мл [3, 4, 14].

Отметим, что данные величины характеризуют лишь правильность и, естественно, никак не могут учесть субъективный фактор (связанный, прежде всего, с квалификацией персонала).

Учитывая, что участники 3 раунда ППТ могли использовать мерную посуду, не отвечающую требованиям ЕФ [4, 14], а 2 класса [16], представляет интерес оценка неопределенности пробоподготовки в этом случае:
Мерная посуда 2 класса:

$$\begin{aligned} max \Delta_{SP}(st) &= \\ &= \sqrt{\left(\frac{100 \cdot 0.2}{50}\right)^2 + 0.20^2 + 0.20^2} = 0.49 \%, \\ max RSD_{SP}(st) &= \\ &= max \Delta_{SP} / 1.96 = 0.25 \%. \\ max \Delta_{SP}(sample) &= \\ &= \sqrt{0.20^2 + 0.20^2} = 0.28 \%, \\ max RSD_{SP}(sample) &= \\ &= max \Delta_{SP} / 1.96 = 0.14 \%, \end{aligned} \quad (14)$$

где:

0.20 % – максимально допустимая относительная неопределенность объема мерной колбы 2 класса вместимостью 100 мл [16].

Отметим значительные различия между $max RSD_{SP(sample)}$ и $max RSD_{SP}(st)$ (почти в 2 раза). При этом сами эти величины в обоих случаях (12-13) невелики, поскольку не учи-

тывает субъективный фактор. Если субъективный фактор незначим, должно выполняться соотношение [10]:

$$\frac{RSD_{SP}^2(sample)}{\max RSD_{SP}^2(sample)} \leq F[0.99, 110, \infty] = 1.341. \quad (15)$$

$$\frac{RSD_{SP}^2(st)}{\max RSD_{SP}^2(st)} \leq F[0.99, 110, \infty] = 1.341.$$

Невыполнение соотношения (15) свидетельствует только о вкладе субъективного фактора (квалификации аналитика) и/или о проблемах в системе обеспечения качества в лаборатории (калибровка посуды, мониторинг за состоянием весов, статистический контроль результатов анализа и т.д.).

2.4. Воспроизводимость удельного показателя поглощения в разных лабораториях: требования

Для того, чтобы при спектрофотометрическом анализе готовых лекарственных средств (а только для них ГФУ [1] и рекомендует этот метод) можно было использовать метод удельного показателя поглощения, необходимо, по крайней мере, чтобы неопределенность удельного показателя поглощения была незначима по сравнению с допусками содержания анализируемого вещества (т.е. не превосходила максимально допустимую неопределенность анализа) [4]. Учитывая, что ГФУ [1] рекомендует этот метод только для допусков содержания не меньше $\pm 10\%$ от номинального содержания, это означает [4], что предельно допустимый доверительный интервал удельного показателя поглощения ($\Delta_{A-1\%}$) должен удовлетворять требованиям:

$$\Delta_{A-1\%} \leq 0.32 \cdot 10 = 3.2\%. \quad (16)$$

При выполнении соотношения (16) различие удельных показателей в разных лабораториях значимо не сказывается на принятии решений о качестве анализируемого готового лекарственного средства [4].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В Табл. 1 приведены результаты статистической обработки результатов количественного определения КС в тестовом образце КС, полученных в рамках 3 раунда ППТ [2]. Подробный анализ этих данных с точки зрения соответствия их аттестованному значению

сделан ранее [2]. В данной работе нашей задачей была лишь оценка статистических характеристик этих результатов.

3.1. Сходимость оптической плотности с рандомизацией положения кюветы

Как видно, сходимость оптической плотности с рандомизацией положения кюветы различается для стандарта ($RSD_{spectr}(st) = 0.551\%$) и тестового образца ($RSD_{spectr}(sample) = 0.485\%$). Данное различие ($F = 1.292$) значимо по критерию Фишера на уровне 95% ($F > F(95\%, 330, 330) = 1.199$), но не значимо (хотя и на пределе) на уровне 99% ($F > F(99\%, 330, 330) = 1.293$), т.е. нуждается в дополнительных исследованиях [10]. Поскольку стандартный и тестовый раствор ничем не отличаются друг от друга (это спиртовые растворы КС в близких концентрациях), данное различие можно объяснить только субъективным фактором. Например, ухудшением состояния кюветы (за счет попадания раствора на ее стенки) при переходе от тестового (который измерялся вначале) к стандартному раствору (который измерялся позже).

Следует отметить очень большие различия в величинах RSD_{spectr} для разных лабораторий – от 0.000 до 1.581, что говорит о явной неоднородности выборки (можно показать, что выборка неоднородна по Кокрену [10] на уровне 99% - как для тестового, так и для стандартного растворов). Это связано как с различием в оборудовании, так и с субъективными факторами (в частности, значение 0.000 для лаборатории № 42).

Учитывая, что различие между схожимостью оптической плотности тестового и стандартного раствора не значимо на уровне 99%, и этого различия не должно, в принципе, быть, было рассчитано объединенное стандартное отклонение оптической плотности с рандомизацией положения кювет $RSD_{spectr} = 0.519\%$. Это значение практически совпадает со значением ($RSD_{spectr}(Att) = 0.50\%$), полученным на стадии аттестации тестовых образцов [9], т.е. соотношение (10.1) выполняется. Это означает, что результаты аттестации тестовых образцов и результаты 3 раунда ППТ получены на оборудовании примерно одного класса и являются сравнимыми. Отметим, что такими же значениями ($RSD_{spectr} = 0.45\%$) характеризовались отечественные спектрофотометры типа СФ-16 и пятнадцать лет назад [11].

В то же время данное значение ($RSD_{spectr} = 0.519\%$), хотя и позволяет проводить одновол-

Таблица 1

Статистическая обработка результатов анализа тестовых образцов КС в 3 раунде ППТ

Код лаборатории	$RSD_{R,t}$ (st)%	$RSD_{R,t}$ (sample)%	$RSD_{spectr,t}$ (st)%	$RSD_{spectr,t}$ (sample)%	$A_{1cm,i}^{1\%}$	X%
01	1.441	1.220	0.183	0.144	572.3	99.9
02	0.329	1.252	0.166	0.261	556.9	100.4
03	0.582	0.451	0.474	0.546	549.4	99.2
04	0.140	0.074	0.182	0.213	546.9	94.8
05	0.034	0.108	0.084	0.108	556.3	96.1
06	0.055	0.630	0.215	0.266	509.0	98.8
07	0.098	0.400	0.473	0.354	566.6	97.7
08	0.580	0.785	0.462	0.435	530.9	102.8
09	0.136	0.287	0.160	0.162	562.0	97.1
10	0.545	0.985	0.976	0.739	537.6	99.6
11	0.114	0.997	1.120	0.423	549.5	98.2
12	0.030	0.372	0.363	0.361	557.4	97.8
13	1.283	1.016	0.162	0.653	573.9	97.3
14	0.725	0.940	0.261	0.840	545.3	99.5
15	0.120	0.157	0.087	0.187	522.5	102.1
16	1.002	1.400	0.917	0.868	552.5	99.4
17	0.805	0.248	0.291	0.162	542.8	100.1
18	0.555	0.299	0.133	0.112	539.3	95.6
19	0.470	0.366	0.566	0.411	546.5	100.4
20	0.133	0.266	0.463	0.652	547.0	98
21	0.253	0.195	0.188	0.219	559.9	97.9
22	0.283	0.347	0.159	0.162	557.5	97.8
23	0.061	0.094	0.087	0.123	545.6	99.4
24	0.149	0.592	0.208	0.209	549.7	98.5
25	0.023	0.163	0.341	0.473	543.4	99.6
26	0.134	0.073	0.443	0.573	561.1	97.1
27	0.993	0.541	0.558	0.301	559.9	95.8
28	0.667	1.734	0.180	0.578	545.4	97.9
29	0.048	0.071	0.061	0.087	544.7	99.2
30	0.034	0.522	0.393	0.472	554.2	99.3
31	0.191	0.094	0.210	0.282	560.7	96.6
32	2.885	2.955	1.274	0.402	545.3	96.9
33	0.353	0.965	0.529	0.549	557.4	98.3
34	0.501	0.976	0.135	0.270	559.2	96.5
35	0.164	0.128	0.140	0.213	541.9	96
36	0.254	0.246	0.171	0.122	549.8	99.5
37	0.801	0.244	0.133	0.261	546.2	99.2
38	1.531	1.958	0.112	0.062	546.8	101.1
39	1.231	0.540	0.225	0.273	560.9	102.2
40	0.480	0.698	0.610	1.048	548.8	100.4
41	0.102	0.745	0.081	0.071	549.8	97.1
42	0.744	0.846	0.000	0.270	538.7	99.4
43	0.032	0.055	0.058	0.073	564.8	97.9
44	0.417	0.717	0.536	1.318	547.0	99.1
45	0.146	0.379	0.217	0.208	559.9	97.8
46	0.329	0.069	0.118	0.044	566.4	97.9
47	1.212	0.707	1.500	0.418	543.0	96.8



Таблица 1 (продолжение)

Код лаборатории	$RSD_{R,t}$ (st)%	$RSD_{R,t}$ (sample)%	$RSD_{spectr,t}$ (st)%	$RSD_{spectr,t}$ (sample) %	$A_{1cm,i}^{1\%}$	X%
48	0.207	0.157	0.125	0.124	537.0	99.8
49	0.083	0.128	0.147	0.061	554.3	98.2
50	1.685	1.618	0.956	1.419	527.9	93.7
51	0.283	0.219	0.061	0.092	566.2	98
52	3.165	5.021	1.459	0.545	547.7	98.7
53	2.324	0.328	0.174	0.060	561.1	99.8
54	0.485	1.603	1.581	0.849	550.6	99.9
55	0.184	2.635	0.572	0.546	551.1	100.3
Среднее квадратичное	0.892	1.131	0.551	0.485	550.33*	98.52
Min	0.023	0.055	0	0.044	509	93.7
Max	3.165	5.021	1.581	1.419	573.9	102.8
	$RSD_X = 0.832\%$ worst $RSD_X(tot) = 1.132\%$		$RSD_{spectr} = 0.519$		Различие = 11.8 %	Различие = 9.1 %
RSD_{SP}	0.840 > 0.25	1.091 > 0.14	$RSD_{FAO} = 0.300$		$RSD = 2.16\%$	$RSD_X(exp) = 1.829\%$
					$\Delta_{A-1\%} = 4.33\%$	

* среднее арифметическое

новое спектрофотометрическое количественное определение всех лекарственных средств методом стандарта, но более чем вдвое превышает рекомендуемую величину 0.25 % [3]. Учитывая, что среди участников 3 раунда ППТ было значительное количество лабораторий, оснащенных современными приборами, позволяющими получать величины $RSD_{spectr} = 0.2\%$ и менее (из Табл. 1 видно, что таких лабораторий и в самом деле немало), можно сделать вывод, что главными причинами полученной большой величины RSD_{spectr} (0.519 %) являются приборные и субъективные факторы. К ним относятся, прежде всего, неудовлетворительное состояние кюветодержателя (приводящее к невоспроизводимости положения кюветы) и некорректная техника выполнения измерений оптической плотности.

Отметим, что состояние кюветодержателя не регламентируется паспортными данными спектрофотометра и обычно не проверяется перед измерениями оптической плотности. Опыт показывает, что плохое состояние кюветодержателя легко может привести к величинам $RSD_{spectr} > 1\%$. В частности, это можно предположить для лабораторий № 10, 16, 50 и 54, где величины RSD_{spectr} очень велики (> 0.7 %) и мало меняются при переходе от тестового образца к стандарту (что говорит о постоянности фактора влияния).

Некорректная техника измерений оптической плотности состоит в том, что капли

измеряемого раствора попадают на внешнюю стенку кюветы, и их затем трудно удалить вытиранием (поскольку КС и ее растворы бесцветны). Преобладание этого фактора можно предположить для лабораторий 11 и 44, где различия между тестовым и стандартным растворами велики (в 2.5-3 раза). В большинстве же случаев имеет место сочетание обоих факторов.

Для получения корректных результатов, для каждого спектрофотометра необходимо периодически проверять величину RSD_{spectr} (на стандартном растворе какого-нибудь исследуемого вещества или фармакопейном растворе калия бихромата [1]). Данная величина не должна превышать 0.25 %. Такая процедура является обязательной частью квалификации оборудования при валидации спектрофотометрических методик анализа ЛС [3].

Отметим, что полученная средняя величина воспроизводимости оптической плотности с рандомизацией положения кюветы $RSD_{spectr} = 0.519\%$ является достаточной для количественного определения готовых ЛС методом одноволновой спектрофотометрии при допусках содержания действующего вещества $B = 5\%$ и выше, т.е. для всех ГЛС [3]. Однако применение более сложных методов (например, двухволновой и многокомпонентной спектрофотометрии) может быть некорректным [3].

3.2. Относительное стандартное отклонение нормированной оптической плотности (величины R)

Как видно из Табл. 1, относительные стандартные отклонения нормированной оптической плотности для стандарта ($RSD_R(st) = 0.892\%$) и тестового ($RSD_R(sample) = 1.131\%$) растворов значимо различаются по критерию Фишера на уровне 99 % [10]. Это связано с различием в пробоподготовке этих растворов (см. соотношения (12-13)).

При этом наблюдаются большие различия между лабораториями — от 0.023 % до 3.160 % для стандарта и от 0.055 % до 5.021 % для испытуемого раствора, что говорит о явной неоднородности выборки (можно показать, что выборка неоднородна по Кокрену [10] на уровне 99 %).

Одной из возможных причин больших различий RSD_R для стандарта и тестового образца могла бы быть их неоднородность. Однако незначимость неоднородности тестового образца КС контролировалась на стадии его аттестации [2], а контроль неоднородности ФСО является обязательным этапом их аттестации [17].

Следует отметить, что величины RSD_R для стандарта и тестового образца существенно (более, чем в 2.5 раза) превышают как теоретическое предельное относительное стандартное отклонение пробоподготовки $maxRSD_{SP}$ (0.34 % и 0.41 % - см. соотношения (12-13)), так и относительное стандартное отклонение конечной аналитической операции RSD_{FAO} (0.300 %). Наиболее вероятной причиной этого может быть субъективный фактор. Действительно, величины RSD_R для стандарта и тестового образца не должны заметно различаться, учитывая одинаковость конечной аналитической операции и незначительных различий в относительных стандартных отклонениях пробоподготовки (0.34 % и 0.41 %). В то же время, например, различие между стандартом и тестовым образцом для лаборатории под кодом 53 (2.324 и 0.328) значимо по критерию Фишера на уровне 98.0 %, а для лаборатории под кодом 55 (0.184 и 2.635) — на уровне 99.5 %.

3.3. Неопределенность пробоподготовки

Как видно из Табл. 1 и соотношений (12-14), найденное относительное стандартное отклонение пробоподготовки в 3.4 — 7.8 раз превышало максимально допустимые даже с использованием посуды второго класса значения ($RSD_{SP}(st) = 0.840\% > 0.25\%$,

$RSD_{SP}(sample) = 1.091\% > 0.14\%$) и вносило основной вклад в суммарную неопределенность анализа. Соотношение (15) явно не выполняется. Как уже отмечалось в п. 2.3, причиной этого может быть только субъективный фактор.

Интересным является тот факт, что $RSD_{SP}(sample) = 1.091\%$ значимо по критерию Фишера (на уровне $> 99\%$) больше $RSD_{SP}(st) = 0.840\%$, хотя, в соответствии с (12-14), должно быть наоборот. Из п. 2.3 видно, что пробоподготовка тестового образца отличается от пробоподготовки стандарта лишь тем, что вместо навески 50 мг отбирается 5 мл. Поэтому можно предположить, что отбор объема 5 мл дает гораздо большую субъективную погрешность, чем взвешивание.

Как уже указывалось выше (п. 2.3), уравнения (12-14) учитывают только паспортную предельную неопределенность мерной посуды, но не могут, естественно учесть квалификацию персонала. Паспортная неопределенность мерной посуды (связанная с точностью ее калибровки) выступает при анализе как постоянная погрешность, а субъективный фактор — как случайная погрешность.

Для оценки соотношения между этими двумя факторами нами было проведено исследование точности взятия объема воды и спирта пипетками 2 класса (поскольку, как показано выше, многие лаборатории именно с ними и работали) двумя аналитиками — неопытным (1) (студент-практикант) и имеющим практический опыт работы (2). Исследование проводилось для воды и для спирта пипеток объемом 1 мл, 2 мл, 5 мл и 10 мл. Отбираемые объемы помещали в колбу и взвешивали. Операцию повторяли не менее 30 раз. Рассчитывали относительное стандартное отклонение ($RSD\%$), доверительный интервал ($D\%$), фактический средний объем пипетки (используя табличные значения плотностей при температуре эксперимента) и отклонение его от номинального значения. Полученные величины (см. Табл. 2) не претендуют на полноту и носят сугубо иллюстративный характер. Для сравнения в Табл. 2 приведены также требования ГОСТ [16] для пипеток 1 и 2 класса.

Из данных Табл. 2 можно сделать следующие выводы:

1. Фактическая погрешность объема пипетки может превышать паспортные значения, особенно для 96 % спирта (и, по-видимому, для всех других неводных растворителей).

Таблица 2
 Результаты определения фактического объема пипеток

Номинальный объем, мл	Требования ГОСТ [16], Δ%		Фактически найдено					
	1 класс **	2 класс	Аналитик 1			Аналитик 2		
			Отклонение среднего от номинала, %	RSD%	Δ%	Отклонение среднего от номинала, %	RSD%	Δ%
1	0.6	1.0	-0.67	2.20	4.39	+0.68	0.23	0.46
2	0.5	1.0				-0.056 -1.06 -1.55*	0.20 0.19 0.23*	0.40 0.37 0.46*
5	0.6	1.0				+0.47	0.15	0.30
10	0.5	1.0	-1.66	0.37	0.74	-1.01 -1.20*	0.082 0.16*	0.16 0.31*

* для 96 % спирта;

** соответствует фармакопейным требованиям [4, 14, 16].

Поэтому используемые пипетки нуждаются в калибровке.

2. Случайная составляющая неопределенности взятия объема пипетками вместимостью 1 мл и 2 мл (аналитик 2) примерно равна паспортной неопределенности пипеток 1 класса, что следует учитывать при прогнозе неопределенности пробоподготовки. В случае пипеток вместимостью 5 мл и 10 мл случайная составляющая примерно равна половине паспортной неопределенности пипеток 1 класса. Случайная составляющая мало зависит от класса пипеток, поэтому можно ожидать, что эти выводы, полученные на пипетках 2 класса, применимы и к пипеткам 1 класса.

3. Субъективный фактор в случайной составляющей неопределенности взятия объема играет огромную роль. Так, для пипеток вместимостью 1 мл различие в случайной составляющей между неопытным и опытным аналитиками достигало $4.39/0.46 = 9.5$ раз. При этом отклонение среднего объема от номинала находилось в пределах значений ГОСТ.

Таким образом, можно сделать вывод, что главной причиной большой неопределенности пробоподготовки является субъективный фактор. Как показывают исследования других методов, роль субъективного фактора при проведении анализа может быть очень значительной [12].

3.4. Воспроизводимость удельного показателя поглощения: результаты

Из Табл. 1 видно, что среднее арифметическое значение удельного показателя поглощения КС в 96 % спирте при длине волны 236 нм равно 550.3 с относительным стандар-

тным отклонением $RSD = 2.16\%$. Это соответствует доверительному интервалу единичного значения $t(95\%, 54) \cdot RSD = 2.005 \cdot 2.16 = 4.33\%$. Максимальное различие между значениями удельных показателей КС разных лабораторий очень велико (11.8%), хотя и существенно меньше различий (18%) 25-летней давности [18]. Ситуацию существенно не изменяет и исключение явно выпадающего значения удельного показателя 509.0 (отклонение от среднего значения 550.3 равно 7.51% или $3.47 \cdot RSD$). При этом среднее значение повышается до 551.1, RSD уменьшается до 1.91, а максимальное различие между удельными показателями уменьшается до $573.9 - 522.5 = 51.4$ или 9.3%. Доверительный интервал (вероятность 95%) уменьшается до 3.83%, однако он все равно превышает максимально допустимую величину (3.2%) из соотношения (16), т.е. значимо сказывается на принятии решений о качестве анализируемого лекарственного средства даже при допуске содержания $\pm 10\%$.

Учитывая, что удельный показатель поглощения определялся каждой лабораторией-участницей как среднее из 3 параллельных навесок салициловой кислоты, полученное для него RSD (2.16% или 1.91%) примерно в 4 раза превосходит относительное стандартное отклонение среднего значения нормированной оптической плотности стандартного образца $(RSD_{R,t}(st)/\sqrt{3} = 0.892/\sqrt{3} = 0.52\%)$. Поэтому ясно, что столь большие расхождения (11.8% или 9.3%) в удельных показателях разных лабораторий не могут быть объяснены даже большой неопределенностью пробоподготовки, а **связаны, главным образом, с различиями между спектрофотометрами.**

Как уже говорилось во введении, требования ЕФ и ГФУ [1] к воспроизводимости удельного показателя поглощения калия дихромата при разных длинах волн соответствуют абсолютной неопределенности оптической плотности 0.01 ед. Среднее значение оптической плотности раствора КС в нашем случае было около 0.55. Это отвечает допустимой по ГФУ неопределенности удельного показателя поглощения КС не более $100 \cdot 0.01 / 0.55 = 1.82 \%$, что в 2-2.5 раза меньше реально наблюдаемого в нашем случае доверительного интервала (4.33 % или 3.83 %). Это подтверждает высказанное выше предположение о том, что главной причиной больших различий удельных показателей поглощения в разных лабораториях являются различия между спектрофотометрами и их несоответствие требованиям ГФУ по величине удельного показателя поглощения раствора калия дихромата [1].

Таким образом, в настоящее время применение в лабораториях по анализу качества лекарственных средств Украины в спектрофотометрическом анализе метода удельного показателя поглощения даже для готовых лекарственных средств с допусками содержания анализируемого вещества $\pm 10 \%$ (а только такой вариант и рекомендуется ГФУ [1]) чревато опасностью получения в разных лабораториях результатов, которые приведут к различным выводам о качестве. Поэтому в этом случае в АНД необходимо обязательно вводить контроль оптической плотности спектрофотометра по бихромату калия [18].

3.5. Средняя полная неопределенность содержания кислоты салициловой в тестовом образце

Среднее относительное стандартное отклонение неопределенности содержания КС равно $RSD_x = 0.832 \%$, что соответствует доверительному интервалу $\Delta_x = 1.63 \%$. Даже в худшем случае (использование посуды 2 класса и некорректном применении метода стандарта) величина $worst RSD_x(tot) = 1.132 \%$, что соответствует доверительному интервалу $\Delta_x(tot) = 2.22 \%$. Данное значение, хотя и превышает обычную неопределенность однокомпонентной спектрофотометрии ($\leq 1.0 \%$ [1]), но является вполне достаточным для данного анализа, поскольку существенно меньше предельного значения ($\leq 3.2 \%$ [9]). Однако доверительный интервал полученных участниками ППТ-3 результатов определения

содержания КС в тестовом образце ($RSD(KC) = 1.83 \%$ [2], что соответствует доверительному интервалу $\Delta(KC) = 3.67 \% > 3.2 \%$) более чем вдвое превышает $\Delta_x = 1.63 \%$, более чем в 1.5 раза - наихудший случай (2.22 %) и выше предельно допустимого значения 3.2 %, что объясняет большое количество неудовлетворительных результатов лабораториями в 3 раунде ППТ при анализе раствора КС [2].

Величины Δ_x характеризуют воспроизводимость результатов внутри лаборатории. Анализ выполнялся методом стандарта, при котором постоянные погрешности, связанные с прибором (в частности, различие в удельных показателях поглощения) нивелируются. Поэтому главной причиной большой величины $\Delta(KC)$ (3.67 %) является субъективный фактор, в частности, некорректная пробоподготовка и некорректное выполнение спектрофотометрических измерений.

Как показали исследования [15], последний фактор (в частности, наличие — для двухлучевых спектрофотометров - кюветной разности до 0.1 единицы оптической плотности [15]) может приводить к очень большим и неконтролируемым погрешностям, которые, вообще говоря, уже не носят случайный характер, а могут систематически сдвигать результаты в какую-либо сторону. Именно это объясняет тот факт, что среднее значение величины X (98.52 %) существенно отличалось от приписного значения.

Выводы

1. Впервые проведен систематический анализ метрологических характеристик метода спектрофотометрии с выделением различных типов погрешностей на примере анализа раствора кислоты салициловой в 96 % спирте в межлабораторном эксперименте в рамках 3 раунда Программы профессионального тестирования лабораторий в системе Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины.

2. Среднее относительное стандартное отклонение измерений оптической плотности с рандомизацией положения кюветы в лабораториях-участницах 3 раунда ППТ составляло 0.52 %, что позволяет проводить количественное определение всех готовых лекарственных средств методом одноволновой спектрофотометрии в варианте метода стандарта. Данное значение, однако, вдвое превышает рекомендованное (0.25 %), что затрудняет применение многоволновых методик. Полу-

ченную величину 0.52 % следует учитывать при валидации и при прогнозе погрешности спектрофотометрического анализа в других лабораториях.

3. Расхождение в величинах удельных показателей поглощения кислоты салициловой в разных лабораториях достигало 11.8 %. Это ставит под сомнение возможность использования метода показателя поглощения для контроля качества готовых лекарственных средств даже с допусками содержания $\pm 10\%$ без введения в АНД дополнительного контроля оптической плотности по калия бихромату. Главная причина – приборный фактор.

4. Основной вклад в полную неопределенность анализа вносила неопределенность пробоподготовки, которая в несколько раз превышала как теоретически допустимые значения, так и неопределенность собственно спектрофотометрического измерения. Возможными причинами этого могут быть: неудовлетворительное состояние весов, использование некалиброванных мерных колб и пипеток и, в особенности, субъективный фактор.

5. Полученные значения содержания кислоты салициловой в разных лабораториях характеризуются доверительным интервалом 3.7 %, что превышает предельно допустимую величину (3.2 %) для данного анализа. Столь значительная неопределенность, связанная, в значительной степени, с некорректным выполнением спектрофотометрических измерений, объясняет большое количество неудовлетворительных результатов анализа салициловой кислоты в 3 раунде ППТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. - 556 с.
2. Сур С.В., Архипова Н.Н., Зволинская Н.Н., Леонтьев Д.А.. Результаты третьего раунда программы профессионального тестирования лабораторий «Фарма-тест» в системе Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины // Вісник фармакології і фармації. – 2003. - № 7-8. – С. 45-57.
3. Гризодуб А.И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. – 2002. - № 3. – С. 42-50.
4. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 1. Методики ВЭЖХ // Фізіологічно активні речовини. – 2001. - № 1 (31). - С. 32-44.
5. Said Laik Ali, Arnold Daas, Peter Castle. Results of ultraviolet and visible absorption spectrophotometry – collaborative trial //Pharmeuropa. – 2003. – Vol. 15, No. 4 (October). - P. 633-636.

6. Зволінська Н.М., Герасимчук Т.В., Макаренко О.Г., Левін М.Г., Гризодуб О.І. Розділююча здатність готових пластинок для тонкошарової хроматографії: відповідність вимогам Державної Фармакопеї України // Фармацевтичний журнал. – 2002. - № 2. - С.72-84.
7. Сур С.В., Архипова Н.Н., Зволинская Н.Н. Результаты второго экспериментального раунда Программы профессионального тестирования лабораторий «Фарма-тест» в системе Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств // Фармация Казахстана. – 2003. - № 2. – С. 13–20.
8. Сур С.В. Нарада-семинар з питань проведення третього раунду програми професійного тестування лабораторій з аналізу якості лікарських засобів // Вісник фармакології і фармації. - 2003. - № 3. - С.50-51.
9. Зволінська Н.М., Архипова Н.М., Леонтьев Д.А., Гризодуб О.І. Створення Національної системи професійного тестування лабораторій контролю якості лікарських засобів: атестація зразків для кількісного спектрофотометричного аналізу // Фармацевтичний журнал. – 2003. - № 6. - С. 7-21.
10. Проект общей статьи Государственной Фармакопеи Украины «Статистический анализ результатов химического эксперимента^Н» // Фармаком. – 2003. - №1. – С. 19-53.
11. Гризодуб А.И., Асмолова Н.Н., Георгиевский В.П., Белоброва Н.В. Влияние повторных измерений и расширения набора длин волн на точность многоволновой спектрофотометрии по методу наименьших квадратов // Журн. аналитической химии. - 1989. - Т. 44, № 10. - С.1824 - 1834.
12. Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И., Архипова Н.Н., Зволинская Н.Н., Доценко Т.Н., Денисенко Н.В. Воспроизводимость фармакопейных методик ВЭЖХ при количественном определении лекарственных средств в разных лабораториях: роль неопределенности пробоподготовки // Фармаком. – 2003. - № 4. – С. 4-12.
13. <1251> Weighing on analytical balances. - United States Pharmacopoeia . USP 24-NF 19. Supplement Two. – CD-ROM version. 2000.
14. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 3rd Edition // Pharmeuropa. – 1999. – December. – P.8.
15. Сур С.В., Зволінська Н.М. Дослідження відтворюваності оптичної густини спектрофотометрів лабораторій-учасниць програми професійного тестування лабораторій в системі державної інспекції з контролю якості лікарських засобів МОЗ України // Вісник фармакології та фармації. – 2004. - № 4. – С. 15-22.
16. ГОСТ 29228-91. Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания. – М.: Из-во стандартов, 1992. – 9 с.
17. Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И., Левин М.Г., Доценко Т.Н. Аттестация фармацевтических стандартных образцов: изучение однородности // Фармаком. – 2002. - № 3. - С. 104-116.
18. Перельсон М.Е., Кирьянов А.А., Кривут Б.А. О повышении точности спектрофотометрического анализа путем введения инструментальной поправки // Хим.-фармац. журн. – 1978. - № 8. – С. 130-133.

Резюме

Гризодуб О.І., Зволінська Н.М., Архипова Н.М., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Доценко Т.М.

Відтворюваність фармакопейних спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських засобів в різних лабораторіях

У рамках 3 раунду Програми професійного тестування лабораторій «Фарма – тест» у системі Державної

інспекції з контролю якості лікарських засобів МОЗ України (ППТ) вперше для вітчизняних лабораторій проведено аналіз метрологічних характеристик методу спектрофотометрії при кількісному визначенні 1 % спиртового розчину кислоти саліцилової в міжлабораторному експерименті. Середнє відносне стандартне відхилення вимірювань оптичної густини з рандомізацією положення кювети, одержане лабораторіями-учасницями 3 раунду ППТ склало 0.52 %, що дозволяє проводити кількісне визначення всіх готових лікарських засобів методом однохвильової спектрофотометрії у варіанті методу стандарту. Дане значення, однак, удвічі перевищує рекомендоване (0.25 %), що утруднює вживання багатохвильових методик. Величину 0.52 % слід урахувувати при валідації та прогнозуванні похибки спектрофотометричного аналізу в різних лабораторіях. Розбіжність у величинах питомих показників поглинання кислоти саліцилової в різних лабораторіях сягала 11.8 %. Це ставить під сумнів можливість використання питомого показника поглинання для розрахунку результатів кількісного визначення при контролі якості готових лікарських засобів навіть із допусками вмісту $\pm 10\%$ без уведення до АНД додаткового контролю оптичної густини за калієм дихроматом. Головною причиною такої розбіжності є приладовий чинник. Основний внесок у повну невизначеність аналізу вносить невизначеність пробопідготовки, що у декілька разів перевищує як теоретично припустимі значення, так і невизначеність власне спектрофотометричного вимірювання. Можливими причинами цього можуть бути: незадовільний стан вагів, використання мірних колб і піпеток, що не калібровані, і, особливо, суб'єктивний чинник. Одержані в різних лабораторіях значення вмісту кислоти саліцилової характеризуються довірчим інтервалом 3.7 %, що перевищує гранично припустиму величину (3.2 %) для даного аналізу. Така значна невизначеність, що пов'язана, у значній мірі, із некоректним виконанням спектрофотометричних вимірювань, пояснює велику кількість незадовільних результатів аналізу кислоти саліцилової у 3 раунді ППТ.

Summary

Gryzodub A.I., Zvolinskaya N.N., Arkhipova N.N., Leontiev D.A., Denisenko N.V., Dotsenko T.N.

Reproducibility of pharmacopoeial spectrophotometrical procedures of medication assays in different laboratories

Within the framework of the 3rd round of the laboratories Professional Testing Program (PPT) «Pharma-test» in the system of the State Inspection for Medication Quality Control of Ukrainian Ministry of Health for the first time for the domestic laboratories an analysis of metrological characteristics of spectrophotometric assay of the 1 % salicylic acid ethanol solution in the interlaboratory experiment was conducted. Average relative standard deviation of absorbance measuring with randomisation of cell position for the laboratories taking part in the 3rd PPT round was 0.52 %. It allows carrying out an assay of all the finished medications by single-wave spectrophotometry method in the version of the reference method. This value, however, twice exceeds the recommended one (0.25%), that embarrass an application of the multi-wave methods. The value 0.52 % is to be taken into account in validation and prog-

nosis of the spectrophotometric assay inaccuracy in different laboratories. Variation of specific absorbances of the salicylic acid in different laboratories was up to 11.8 %. It prejudices the possibility of the use of the specific absorbance method for an assay of the finished medications even with content tolerances of $\pm 10\%$ without introduction of additional absorbance control by means of potassium dichromate in the specification. The main cause of such variation is an instrument factor. The principal contribution in the total assay uncertainty is made by a sample preparation uncertainty that is a few times more than both theoretical limits and the uncertainty of final spectrophotometric measurements. The possible causes of this may be: inadequate state of balances, use of the uncalibrated volumetric flasks and pipettes and, especially, subjective factor. The obtained results of salicylic acid content in different laboratories are characterized by a confidence interval of 3.7 % that exceeds a possible limit (3.2 %) for the given analysis. Such considerable uncertainty, caused largely by improper implementation of the spectrophotometric measuring, explains a great number of unsatisfactory results of salicylic acid assay in the 3 round of PPT.

Гризодуб Александр Иванович. Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1971). Зав. лабораторией хроматографии ГП ГНЦЛС. Зам. директора ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» по научной работе (1992). Д.х.н. (1990). Профессор (1996). Действительный член Нью-Йоркской Академии Наук (1994). Член Международной ассоциации официальных аналитических химиков (1997).

Зволинская Наталья Николаевна. Инженер I кат. Центральной лаборатории по анализу качества лекарственных средств МЗ Украины.

Архипова Надежда Николаевна. Мл. науч. сотр. Международной объединенной лабораторной группы (UPAL).

Леонтьев Дмитрий Анатольевич (р. 1963). Окончил биологический факультет Харьковского государственного университета (1986). Работает в лаборатории хроматографии ГНЦЛС (с 1993). Ст. науч. сотр. Руководитель группы «Валидация методик, стандартные образцы и метрология» отдела ГФУ ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр». К.фарм.н. (1997).

Доценко Татьяна Николаевна. Окончила Харьковский государственный университет (1997). Соискатель при ГП ГНЦЛС.

Денисенко Наталья Васильевна. Окончила Харьковский государственный университет (1997). Работает в отделе ГФУ ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр». Мл. науч. сотрудник группы «Валидация методик, стандартные образцы и метрология».

Стандартизація лікарських засобів

УДК 615.07:665.3

Котова Э.Э.

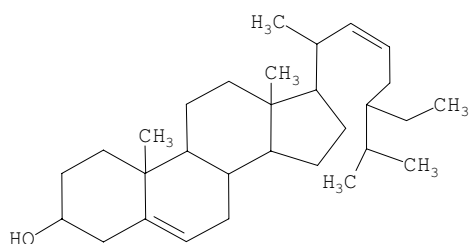
Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

К вопросу о стандартизации некоторых жирных растительных масел и препаратов на их основе

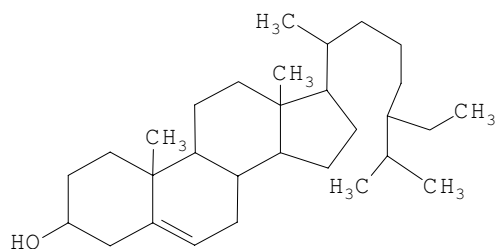
Изучен компонентный состав стеринов некоторых жирных растительных масел, используемых в качестве активных лекарственных субстанций. Разработаны методики определения компонентного состава стериновой фракции и хроматографического профиля неомыляемого остатка масла семян тыквы и препарата «Суппозитории с маслом семян тыквы», а также методика определения количественного содержания стериновой фракции в препарате «Суппозитории с маслом семян тыквы». Указанные методики введены в АНД.

Жиры и жирные масла имеют широкое распространение как в растительных, так и в животных организмах, являясь продуктом обмена веществ. Они представляют собой смеси, состоящие из различных сложных эфиров глицерина с кислотами жирного ряда; кроме того содержат различные сопутствующие вещества. Одними из них являются высокомолекулярные циклические спирты, имеющие стероидный скелет — стерины, составляющие неомыляемую часть жиров [1]. Распространенность стероидных соединений в животном и в растительном мире, а также исключительно важная роль стероидных гормонов в регулировании жизненных процессов обусловили широкий размах научных исследований [2].

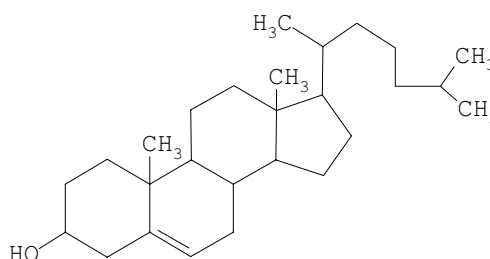
Главный представитель класса стеринов — холестерин (5-холестен-3β-ол). Ниже представлены структурные формулы основных стеринов, присутствующих в растениях.



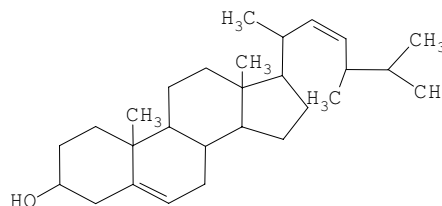
Холестерин (5-холестен-3β-ол)



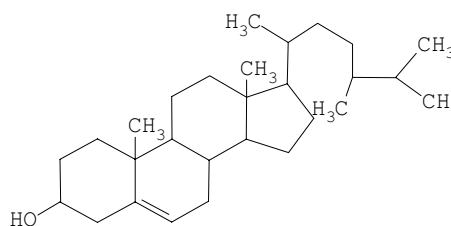
β-ситостерин (5-стигмастен-3β-ол)



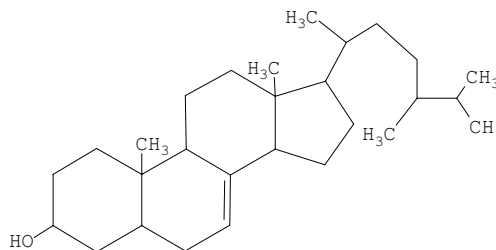
Стигмастерин (5,22-стигмастадиен-3β-ол)



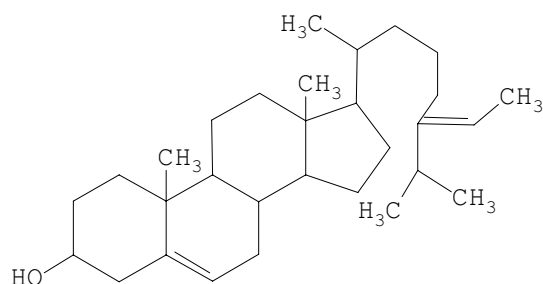
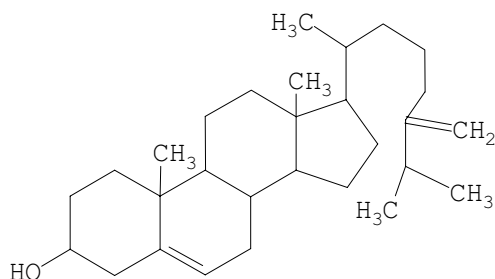
Брассикастерин (5,22-эргостадиен-3β-ол)



Кампестерин [(24R)-5эргостен-3β-ол]



Δ7-Кампестерин

**Δ5,24-стигмадиенол****24-Метилхолестерин**

В Государственной Фармакопее Украины 1 изд. (ГФУ) [3] и Европейской Фармакопее 4-изд. (ЕФ) [4] присутствует общая статья «Стерины в жирных маслах», которая описывает методику определения компонентного состава стериновой фракции в различных растительных маслах и определения количественного содержания стеринов методом газовой хроматографии (ГХ). Методика основана на получении неомыляемого остатка анализируемого масла, далее из неомыляемого остатка методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) выделяют стериновую фракцию, компонентный состав которой определяют методом ГХ после обработки силилирующим реактивом.

Кроме того, для идентификации отдельных стеринов параллельно с испытуемым маслом проводят омыление масла рапсового и масла подсолнечного. Из выделенных фракций стеринов названных масел готовят растворы сравнения, проводя их силилирование аналогично испытуемому препарату и хроматографируют полученные растворы на газовом хроматографе в условиях, описанных в методике.

На хроматограмме раствора, полученного из рапсового масла, при этом обнаруживаются три пика стеринов: браССикастерин, кампестерин и β-ситостерин, на хроматограмме раствора, полученного из подсолнечного мас-

ла, обнаруживаются 4 основных пика: кампестерин, стигмастерин, β-ситостерин и Δ7-стигмастенол. Идентификацию стеринов анализируемых масел проводят по относительным временам удерживания обнаруженных пиков относительно пика β-ситостерина, которые приведены в таблице 2.4.23.-1 ГФУ. ЕФ регламентирует состав стериновой фракции в следующих растительных маслах:

— оливковое масло рафинированное и нерафинированное (сумма β-ситостерина, Δ5,23-стигмадиенола, клеростерина, ситостанола, Δ5-авенастерина и Δ5,24-стигмадиенола — не менее 93 %, холестерин — не более 0.5 %, Δ7-стигмастенол — не более 0.5 %, кампестерин — до 4 %.

— миндальное масло рафинированное (β-ситостерин — 73-87 %, холестерин — не более 0.7 %, кампестерин — до 5 %, стигмастерин — до 4 %, Δ5-авенастерин — не менее 5 %, Δ7-авенастерин — не более 3.0 %, браССикастерин — не более 0.3 %.

— миндальное масло нерафинированное (β-ситостерин 73-87 %, холестерин — не более 0.7 %, кампестерин — до 4 %, стигмастерин — до 3 %, Δ5-авенастерин — до 10 %, Δ7-стигмастенол — не более 3.0 %, браССикастерин — не более 0.3 %

— соевое масло (браССикастерин — не более 0.3 %).

— кукурузное масло (браССикастерин — не более 0.3 %).

— масло зародышей пшеницы (браССикастерин — не более 0.3 %).

В ГФУ не представлены монографии на растительные масла. В действующей аналитической нормативной документации (АНД) на жирные масла на регламентируется компонентный состав стериновой фракции.

Целью данной работы явилось изучение стеринового состава некоторых растительных масел, используемых в качестве как активных лекарственных субстанций, так и вспомогательных веществ, а также изучение возможности стандартизации качества масел и препаратов, изготовленных на их основе, по компонентному составу стериновой фракции.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования выбраны некоторые жирные масла, которые используются в качестве активных лекарственных субстанций, а именно: масло облепиховое, масло расторопши, масло амаранта, масло семян тыквы, а также препарат «Тыквеол»

(Россия), который представляет собой масло семян тыквы.

При определении компонентного состава стериновой фракции за основу была взята общая статья 2.4.23 «Стерины в жирных маслах» ГФУ.

По методике данной статьи нами были идентифицированы стерины 5 указанных масел. На хроматограммах растворов, полученных из перечисленных масел, были обнаружены пики, которые в соответствии с данными Табл. 2.4.23.-1 ГФУ идентифицированы по относительным временам удерживания как: брассикастерин; 24-метилхлестерин; кампестерин; стигмастерин; Δ7-кампестерин; Δ5,23-стигмадиенол; β-ситостерин; ситостанол; Δ5,24-стигмадиенол; Δ7-стигмастерин; Δ7-авенастерин. Сводные данные о компонентных составах стеринов перечисленных масел приведены в Табл. 1.

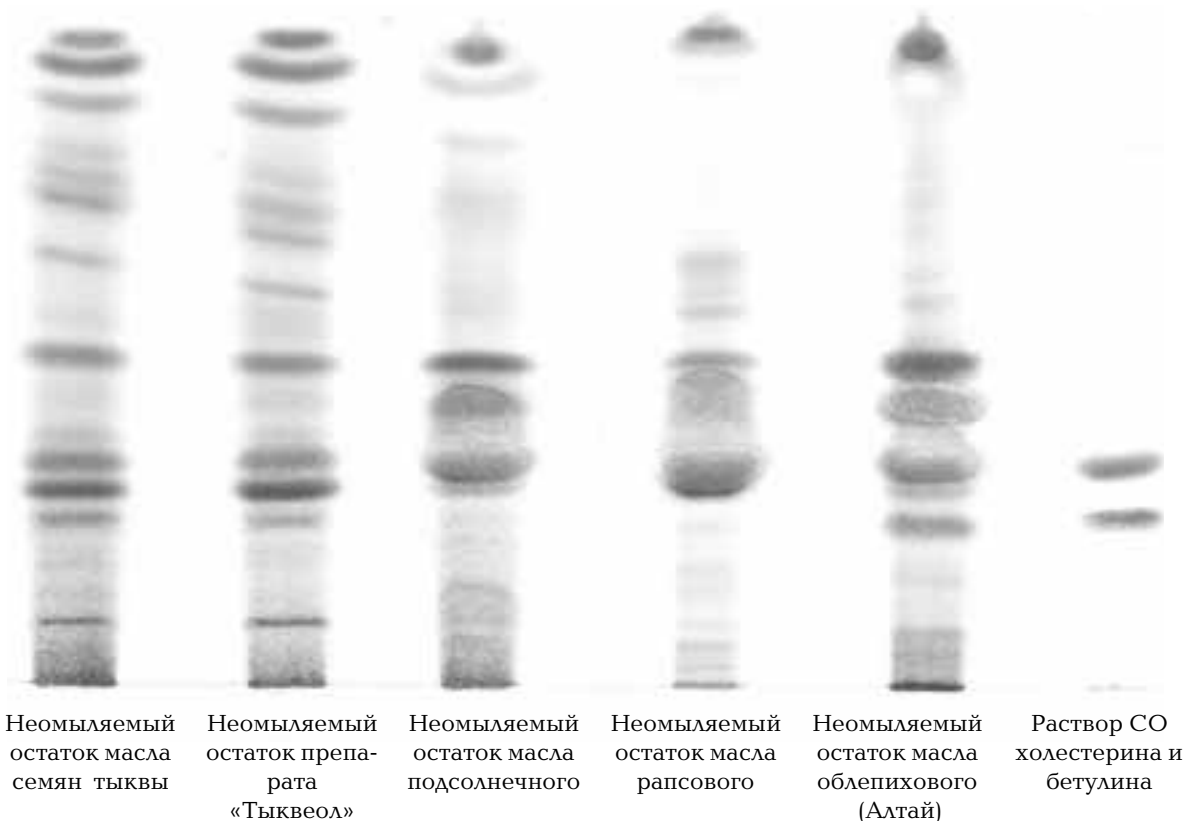
Как видно из Табл. 1, проанализированные масла достаточно характерно отличаются друг от друга как по компонентному составу стериновой фракции, так и по процентному содержанию отдельных стеринов. В то же время масло семян тыквы и препарат «Тык-

веол» имеют одинаковый стериновый состав и близкое процентное содержание каждого из стеринов.

При разработке АНД на масло семян тыквы мы столкнулись с трудностями, связанными с тем, что данное масло имеет очень неспецифические показатели качества. Так как оно не отличается от большинства жирных масел по содержанию каротиноидов и фосфолипидов [5], а компонентный состав жирных кислот масла семян тыквы (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и линолевая кислота) очень близок к другим маслам (практически совпадает с составом жирнокислотной фракции кукурузного масла), легко возможна фальсификация используемого масла семян тыквы. Поэтому полученные нами данные по компонентному составу стеринов позволили стандартизовать качество масла тыквы по данному показателю и включить раздел «Компонентный состав стеринов» в АНД на препарат.

В процессе разработки АНД на масло семян тыквы при исследовании неомыляемых остатков жирных растительных масел (масла облепихового, масла подсолнечного, масла

Рисунок 1



Хроматографический профиль неомыляемых остатков жирных масел и препарата «Тыквеол»

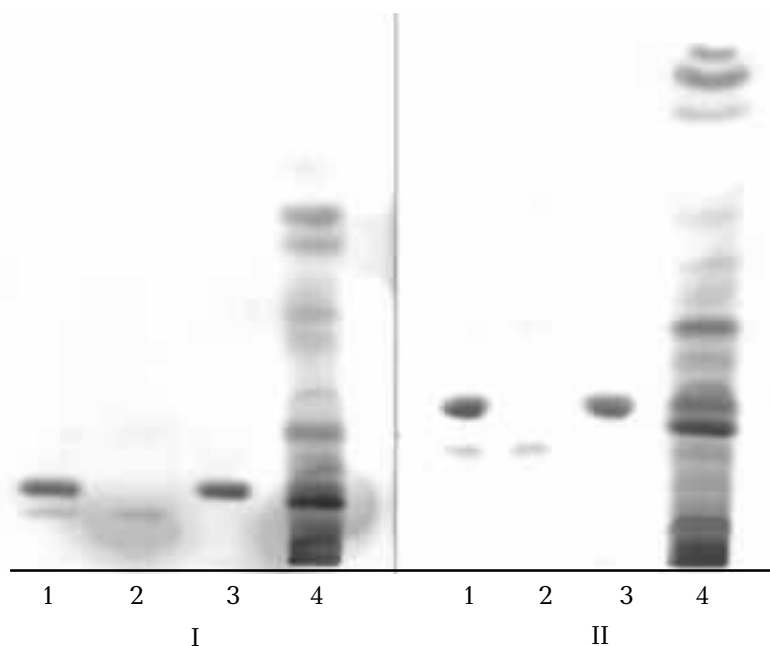
рапсового, масла семян тыквы и препарата «Тыквеол» (взятого в качестве препарата-аналога зарубежного производства)) методом ТСХ было замечено, что хроматографический профиль неомыляемых остатков различных жирных масел отличается друг от друга. Рисунок хроматограмм неомыляемых остатков некоторых масел представлен на Рис.1. Как видно из Рис. 1, на хроматограммах обнаруживаются зоны, которые являются общими для всех испытуемых масел, но присутствуют также зоны и группы зон, которые являются характерными для каждого масла. В то же время хроматографический профиль неомыляемого остатка, например масла семян тыквы, полностью совпадает с хроматографическим профилем неомыляемого остатка, полученным из препарата «Тыквеол».

В связи с этим мы предположили, что хроматографический профиль неомыляемого остатка можно использовать для идентификации масел по наиболее характерным зонам (для масла семян тыквы характерна зона с R_f

около 0.15). Для этого нами была подобрана другая, нежели в методике ГФУ, система растворителей — бензол - этилацетат (45:5), которая позволяет отделять более полярные компоненты неомыляемого остатка, а также более четко разделять стандартную смесь веществ с R_f около 0.20 (бетулин) и с R_f около 0.28 (холестерин). Хроматограммы неомыляемого остатка семян тыквы и раствора бетулина и холестерина, полученные по методике ГФУ и в предлагаемой системе растворителей, приведены на Рис.2.

Далее нами было предложено наносить на первую хроматографическую пластину 20 мкл испытуемого раствора и 20 мкл раствора смеси холестерина и бетулина, на вторую пластину - 40 мкл испытуемого раствора (по методике ГФУ наносят 400 мкл). Хроматографическое разделение нанесенных проб на первой и второй пластине проводилось одновременно и в одинаковых условиях. В качестве проявляющего реактива мы предложили использовать раствор анисового альдеги-

Рисунок 2



Хроматограммы неомыляемого остатка масла семян тыквы и раствора бетулина и холестерина, полученные по методике ГФУ (I) и в предлагаемой системе растворителей (II)

- I. 1 — смесь холестерина и бетулина,
2 — бетулин,
3 — холестерин,
4 — неомыляемый остаток масла семян тыквы
- II. 1 — смесь холестерина и бетулина,
2 — бетулин,
3 — холестерин,
4 — неомыляемый остаток масла семян тыквы

да, который, являясь гораздо более чувствительным реактивом, чем дихлорфлуоресцеин, используемый в методике ГФУ, позволяет получить более четкую визуальную картинку хроматографического профиля и использовать ее для идентификации.

После хроматографирования первая пластинка обрабатывалась раствором анисового альдегида, проявлялась в сушильном шкафу при температуре 100 °С и использовалась одновременно для идентификации неомыляемого остатка, а также для определения фракции стеринов, как области, расположенной между пятнами холестерина и бетулина. Со второй пластинки снимался слой сорбента, соответствующий области, определенной на первой проявленной хроматограмме. Причем, в отличие от методики ГФУ, дополнительно снимались зоны не на 2 мм, а на 5 мм выше пятна холестерина и на 5 мм ниже пятна бетулина. Это связано с выбранными условиями хроматографирования (см. выше). Считаем, что такой подход позволил нам использовать ТСХ неомыляемого остатка одновременно для установления идентификации препарата и для достоверного определения фракции стеринов.

Исходя из проведенных исследований по изучению компонентного состава стериновой фракции масла семян тыквы методом ГХ, нами был сделан вывод о том, что для упрощения достаточно трудоемкой методики при

включении ее в АНД на масло семян тыквы, идентификацию отдельных стеринов препарата можно проводить без использования испытуемых растворов стеринов масла подсолнечного и масла рапсового. Для стандартизации условий хроматографирования мы предложили параллельно с раствором выделенных стеринов масла хроматографировать раствор СО холестерина, β -ситостерина и бетулина и контролировать соответствие времен удерживания пика β -ситостерина и бетулина на хроматограмме испытуемого раствора и раствора СО.

Идентификацию стеринов масла семян тыквы при этом производят по относительным временам удерживания пиков, соответствующих индивидуальным стеринам, измеренных относительно пика β -ситостерина, а также по соответствию хроматограммы испытуемого раствора типичной хроматограмме стериновой фракции масла семян тыквы, приведенной в АНД (Рис. 3). Кроме того, в проверку пригодности хроматографической системы мы предложили дополнительно внести регламентацию относительного времени удерживания пика бетулина (около 1.5).

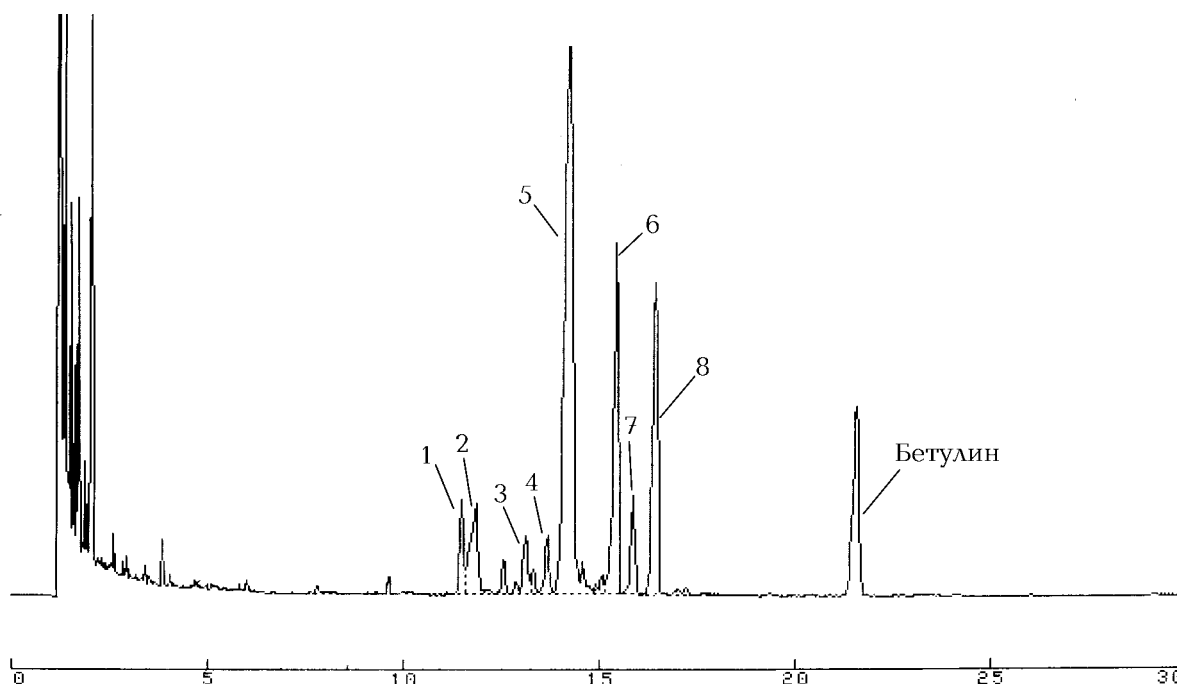
Регламентируемые в АНД пределы процентного содержания отдельных стеринов были выбраны нами в соответствии с проведенными параллельными испытаниями различных серий масла семян тыквы, а также в сравнении с препаратом «Тыквеол».

Таблица 2

Результаты определения компонентного состава стериновой фракции в масле семян тыквы и в препаратах «Тыквеол» и «Суппозитории из масла семян тыквы»

Стерины	Содержание в масле семян тыквы (%)						Содержание в препарате «Тыквеол» (%)		Содержание в суппозиториях (%)		Данные спецификации на импортное масло (%)
	Результаты параллельных определений					Регламентируемые пределы			Серия 1	Серия 2	
холестерин											
24- метилхолестерин	2.05	2.0	2.02	1.85	1.9	1.5-2.7	2.00	2.77	2.26	1.94	
кампестерин	3.70	3.9	4.5	3.4	4.5	2.5-4.5	2.7	3.26	2.76	3.90	не более 4
Δ 7-кампестерин	3.01	2.16	1.9	-	-	-	1.25	1.04	2.26	2.16	не более 4
Δ 5,23-стигмастadiе-нол	2.36	2.8	2.8	3.05	3.2	1-3.3	2.19	3.32	3.38	2.7	
β -ситостерин	54.3	52.6	49.2	49.5	53.0	45-58	52.1	47.5	45.8	57.3	45-55
ситостанол	2.4	1.8	-	0.9	0.7	-	2.36	2.17	0.57	0.67	не более 3
Δ 5,24-стигмастadiе-нол	18.3	17.2	17.8	18.4	19.8	17-22.5	19.2	18.9	20.5	22.3	15-25
Δ 7-стигмастенол	3.57	3.2	4.06	3.5	4.4	3-7.5	5.52	5.14	5.59	4.08	2-7
Δ 7-авенастерин	12.2	11.6	9.9	17.5	12.9	9-17.5	13.0	13.3	14.4	9.25	не менее 10

Рисунок 3



Типичная хроматограмма стериновой фракции масла семян тыквы

- 1 — 24-метилхлестерин
- 2 — кампестерин
- 3 — Δ7-кампестерин
- 4 — Δ5,23-стигмастадиенол
- 5 — β-ситостерин
- 6 — Δ5,24-стигмастадиенол
- 7 — Δ7-стигмастенол
- 8 — Δ7-авенастерин

Полученные нами данные по компонентному составу стериновой фракции масла семян тыквы и регламентируемые пределы для каждого отдельного стерина масла оказались очень близкими к данным, приведенным в спецификации на импортное (Германия) масло семян тыквы (сравнительные данные приведены в Табл. 2).

Таким образом, контроль компонентного состава стеринов и хроматографический профиль неомыляемого остатка позволили нам однозначно идентифицировать масло семян тыквы.

Данный подход к стандартизации качества масла семян тыквы по компонентному составу стериновой фракции мы использовали при разработке АНД на препарат «Суппозитории с маслом семян тыквы». И этот подход оказался оптимальным, так как содержание других веществ (каротиноидов, фосфолипидов) в суппозиториях оказалось значительно (в 30 раз) меньшим по сравнению с содержанием стериновой фракции.

Идентификацию препарата «Суппозитории с маслом семян тыквы» мы предложили проводить по хроматографическому профилю неомыляемого остатка (метод ТСХ) и компонентному составу стеринов (метод ГХ).

При исследовании неомыляемого остатка препарата методом ТСХ перед нами стояла задача показать, что твердый жир, входящий в состав препарата не мешает идентификации и не изменяет хроматографическую картину. Для этого параллельно с препаратом мы проводили омыление масла семян тыквы и омыление твердого жира. Хроматографический профиль на хроматограмме препарата практически совпадает с хроматографическим профилем на хроматограмме масла семян тыквы, что свидетельствует о том, что неомыляемый остаток твердого жира не вносит значительного вклада в хроматографическую картину. Для стандартизации условий хроматографирования при получении неомыляемого остатка нами к навеске препарата был прибавлен раствор бетулина в каче-

стве внутреннего стандарта. На хроматограмме это пятно с R_f около 0.20. Положение остальных пятен на хроматограмме раствора препарата мы предложили регламентировать относительно пятна внутреннего стандарта (R_{st}), которое определяется отношением R_f описываемого пятна к R_f пятна бетулина [6]. Эти величины незначительно отличаются от аналогичных на хроматограмме неомыляемого остатка масла семян тыквы, что связано с тем, что неомыляемые компоненты твердого жира несколько «притормаживают» прохождение хроматографической зоны. Однако это не мешает использовать величины R_{st} для идентификации масла в препарате по наиболее характерным пятнам и, в том числе, довольно характерному для масла семян тыквы пятну $R_{st} = 0.35$.

Считаем, что контроль компонентного состава стеринов и хроматографический профиль неомыляемого остатка позволяет однозначно идентифицировать препарат и отличать входящее в его состав масло семян тыквы от других жирных масел.

При определении показателя «Стерины» в АНД на препарат «Суппозитории с маслом семян тыквы» за основу была взята методика определения компонентного состава стеринов в масле семян тыквы. С целью выяснения влияния твердого жира на компонентный состав стериновой фракции нами из неомыляемого остатка твердого жира методом ТСХ была выделена фракция, по положению совпадающая со стериновой фракцией препарата, которая после силилирования хроматографировалась в условиях определения компонентного состава стеринов. Было установлено, что на хроматограмме фракции, выделенной из неомыляемого остатка твердого жира, пики стеринов отсутствуют, что свидетельствует о том, что присутствие твердого жира не влияет на компонентный состав стериновой фракции препарата.

В АНД на препарат «Суппозитории с маслом семян тыквы» был введен показатель — количественное содержание стериновой фракции в миллиграммах на одну свечу, определение которого проводят с использованием внутреннего стандарта - бетулина. Содержание стериновой фракции в одной свече, в миллиграммах, вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{\sum S_i \times m_0 \times b}{S_0 \times m},$$

где:

- $\sum S_i$ — среднее значение площадей всех пиков, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;
- S_0 — среднее значение площадей пиков бетулина, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;
- m_0 — масса навески бетулина, в миллиграммах;
- m — масса навески препарата, в граммах;
- b — средняя масса одной свечи, в граммах.

Содержание стериновой фракции в одной свече регламентируется не менее 1.7 мг.

Полученные нами данные по количественному содержанию стериновой фракции в препарате «Суппозитории с маслом семян тыквы» очень хорошо согласовались с данными по количественному содержанию стериновой фракции в масле семян тыквы. Так, при определении количественного содержания стериновой фракции в масле было получено среднее значение — 400 мг % (пределы от 390 мг % до 420 мг % при параллельных определениях и с учетом определения в препарате «Тыквеол»). Учитывая, что в состав одной свечи входит 0.5 г масла семян тыквы, получаем теоретическое значение 2.0 мг стериновой фракции в одной свече. Практически было найдено от 1.9 мг до 2.2 мг стериновой фракции в одной свече при анализе различных серий препарата (предел не менее 1.7 мг выбран с учетом возможной погрешности метода и с учетом возможных различных видов используемого масла семян тыквы).

Выводы

1. Изучен компонентный состав стеринов некоторых жирных растительных масел, используемых в качестве активных лекарственных субстанций, по методике статьи 2.4.23 ГФУ «Стерины в жирных маслах».

2. Разработаны методика определения компонентного состава стериновой фракции масла семян тыквы и методика определения хроматографического профиля неомыляемого остатка данного масла. Указанные методики введены в АНД.

3. Разработаны методика определения компонентного состава стериновой фракции и методика определения количественного содержания стериновой фракции препарата «Суппозитории с маслом семян тыквы», методика определения хроматографического профиля неомыляемого остатка препарата. Указанные методики введены в АНД на препарат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гергеш Ш. Количественный анализ стероидов. - Москва: Мир, 1985. - 500 с.
2. Физер Л., Физер М. Стерины. - Москва: Мир, 1964. - 972 с.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - С. 88-90.
4. European Pharmacopoeia, 4th ed.- Strasbourg: Council of Europe, 2002.
5. Беззубов А.П. Химия жиров. - М.: Пищевая промышленность, 1975. - 280 с.
6. Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А. Справочник по биохимии. - Киев: Наукова думка, 1971. - С. 765-774.

Резюме

Котова Е.Е.

До питання про стандартизацію деяких жирних рослинних олій і препаратів на їхній основі

Вивчено компонентний склад стеринів деяких жирних рослинних олій, що використовуються як активні субстанції. Розроблено методики визначення компонентного складу стеринової фракції та хроматографічного профілю неомілюваного залишку олії насіння гарбуза та препарату «Супозиторії з олією насіння гарбуза», а також методика визначення кількісного вмісту стеринової фракції у препараті «Супозиторії з олією насіння гарбуза». Зазначені методики введено до АНД.

Summary

Kotova E.E.

To the matter of some fatty vegetable oils and drugs on the basis of ones

The component composition of sterols of some fatty vegetable oils used as active drug substances had been studied. The procedures of determination of the sterol fraction component composition and the chromatographic profile of the unsaponifiable residue of the pumpkin seed oil and the «Suppositories with the pumpkin seed oil» drug, as well as of sterol fraction quantitative content determination in that one had been developed. These procedures had been introduced in the analytical normative documentation.

Котова Єліна Єдуардовна. Окончила Харківський державний університет (1983). Мл. науч. сотр. лабораторії фармакопейного аналізу ГП НЭФЦ.

УДК 615.244 : 615.322 : 615.453.4

Демьяненко В.Г., Бодри Хамам Салих, Зинченко А.А., Демьяненко Д.В.
Национальный фармацевтический университет
Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

Разработка методик контроля качества препарата «Силицетин»

Проведено дослідження якісного і кількісного складу масла, виділеного з насіння расторопши п'ятнистої (*Silybum marianum L.*) різними способами. Розроблено методики контролю якості нового лікарського препарату рослинного походження «Силицетин», представляючого собою тверді желатинові капсули, заповнені суспензією кверцетину в маслі расторопши. Результати досліджень, проведених на різних серіях препарату, характеризуються достатньою воспроизводимостью.

В настоящее время неблагоприятная экологическая ситуация наряду с побочными эффектами многих синтетических препаратов способствуют широкому распространению заболеваний печени, что обуславливает актуальность поиска новых гепатопротекторов растительного происхождения.

Семена расторопши п'ятнистої містять жирні масла (до 32 % від маси сировини) і комплекс флаволігнанів (силібін, силікохрестин, силідианін), які мають потужний детоксифікуючий, гепатопротекторний і антиоксидантний ефект [6, 8, 10].

На основі сумми флавоноїдних сполучень, виділених з насіння расторопши п'ятнистої (*Silybum marianum L.*), отримують препарати «Силибор», «Карсил», «Силибінин» і др. [5, 8]. Технологія виробництва вказаних лікарських засобів передбачає стадію обезжиривання рослинної сировини, при цьому масло расторопши розгляда-

ється як побічний продукт. С іншої сторони, завдяки високому вмісту поліненасичених жирних кислот, вітаміну Е, каротиноїдів і фітостеролів, воно є цінним лікарським засобом, що володіє протизапальними, ранозаживляючими, антиоксидантними і гепатопротекторними діями [6, 7].

В той же час дослідження [1] показали, що флаволігнани присутні в маслі в дуже незначительних кількостях.

В зв'язі з цим нами було запропоновано гепатопротекторне лікарське засіб «Силицетин», що представляє собою комбінацію масла расторопши з кверцетином в формі суспензії в твердих желатинових капсулах. Фармакологічна активність препарату обумовлена взаємним потенціруванням антиоксидантного ефекту компонентів, що сприяє зменшенню цитотоксичних процесів, ліпоперекисного пошкодження

дения клеток и улучшает функционирование печени [7].

Целью настоящей работы является разработка методик контроля качества лекарственного препарата «Силицетин» в твердых желатиновых капсулах.

Объекты и методы исследований

В исследованиях использовалось масло расторопши заводского производства (ТУУ 15.4 – 23026976 – 001 – 2002), получаемое холодным прессованием семян (далее в тексте – масло 1), а также выделенное нами при экстракции сырья хладоном-12 (масло 2) и хладоном-22 (масло 3).

Масляную суспензию кверцетина готовили следующим образом.

В реактор с турбинной мешалкой с частотой вращения 5000 об/мин загружали 30 г масла расторопши, растворяли в нем 0.03 г эмульгатора спена-65 при температуре (45-50) °С, прибавляли 3.0 г кверцетина, 0.07 г ни-пагина и диспергировали смесь в течение 30 мин [7].

Полученную суспензию фасовали по 0.30 мл с помощью лабораторного дозирующего устройства в твердые желатиновые капсулы № 2, которые затем герметизировали напылением из микрофорсунки 50 % спирта на шов с последующим высушиванием струей холодного воздуха [9].

Для разработки оптимального состава и оценки качества капсул «Силицетин» необходимо было провести сравнительный анализ физико-химических свойств и количественных характеристик масел расторопши 1, 2 и 3.

Вязкость масел (1-3) определяли на капиллярном вискозиметре при температуре 20 °С по методике [2]. В качестве градуировочной жидкости использовалась вода очищенная.

Плотность измеряли с помощью пикнометра согласно [2].

Жирнокислотный состав масел (1-3) определяли по методике [3]. 0.05 г масла помещали в колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 0.5 мл эфира, 5 мл метанола, 0.5 мл ацетилхлорида и перемешивали. Колбу с полученной смесью присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре (65-70) °С в течение 20 мин. Затем раствор выпаривали в токе инертного газа до остаточного объема около 0.5 мл, охлаждали до комнатной температуры, прибавляли 2 мл циклогексана, 1 мл воды, взбалтывали в течение 1 мин и выдерживали до полного разделения слоев. Верхний циклогексановый слой

отделяли и фильтровали через 0.2 г натрия сульфата безводного. 0.5 мкл испытуемого раствора хроматографировали на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

— колонка капиллярная кварцевая, размером 60 м × 0.32 мм, с неподвижной фазой 50 % цианопротил - 50 % метилсилоксан, толщина слоя 0.25 мкм;

— температуру колонки программировали: температуру 175 °С выдерживали в течение 2 мин, затем повышали температуру со скоростью 3 °С/мин до 225 °С, температуру 225 °С выдерживали в течение 15 мин;

— температура испарителя – 240 °С;

— температура детектора – 250 °С;

— скорость газа-носителя (водород) – 1.0 мл/мин;

— деление потока 1:70.

Содержание жирной кислоты в образцах, в процентах от суммарного содержания жирных кислот, вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S_i \cdot 100}{\sum S_i},$$

где:

S_i — среднее значение площади пика метилового эфира жирной кислоты, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

$\sum S_i$ — среднее значение суммарной площади пиков метиловых эфиров жирных кислот, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора.

Качественный анализ масел (1-3) проводили методом ТСХ следующим образом.

Около 0.1 г масла растворяли в 2 мл метилхлорида, 5 мкл раствора наносили на ТСХ-пластинку «Sorbfil UV-254» и хроматографировали в системе гексан - диэтиловый эфир – кислота муравьиная (80:20:2). Когда фронт растворителей проходил 12 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры, высушивали и проявляли 20 % раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле при нагревании до температуры (130-140) °С в течение 3-5 мин.

Для выделения неомыляемой фракции образцы масла массой по 5 г гидролизуют 2М спиртовым раствором калия гидроксида, после чего экстрагировали эфиром [2].

Эфирные извлечения осторожно упаривали досуха, остаток растворяли в 0.2 мл хлороформа, 5 мкл полученного раствора наносили на пластинку «Sorbfil UV-254», помещали

в камеру с бензолом, когда фронт растворителя проходил 10 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры и проявляли пятна 22 % раствором сурьмы трихлорида в хлороформе.

Для количественного определения фитостеролов с необработанных хроматограмм снимали зону с R_f около 0.1-0.2 на уровне пятен, окрашенных в сине-фиолетовый цвет, элюировали стерины тремя порциями, по 15 мл каждая, метиленхлорида, затем проводили анализ элюата методом газовой хроматографии в сравнении с раствором стандарта согласно методике [2].

Для определения суммы токоферолов омыление проводили с добавлением 0.1 г кислоты аскорбиновой, а хроматографирование — в присутствии вещества-свидетеля α -токоферола. Затем снимали слой сорбента на уровне пятна (R_f около 0.65), окрашенного в желто-коричневый цвет, элюировали токоферол безводным метанолом, остаток упаривали досуха, прибавляли 4.0 мл 96 % спирта, 1.0 мл 0.1 % раствора железа трихлорида и 1.0 мл 0.25 % раствора дипиридила. Через 3 мин измеряли оптическую плотность полученной смеси на спектрофотометре при длине волны 520 нм. Параллельно проводили аналогичный опыт с точной навеской стандартного образца α -токоферола [4].

Кислотное, переокисное, йодное числа и число омыления в образцах масла (1-3) определяли по методикам [2].

Оценка качества капсул «Силицетин» проводилась по следующим показателям: однородность массы, распадаемость, растворение, герметичность, подлинность, количественное содержание кверцетина, однородность содержания, микробиологическая чистота.

Однородность массы определяли по методике [2]. Для полного удаления содержимого капсулы вскрывали лезвием, промывали с помощью шприца 2-3 мл метиленхлорида, затем оболочку высушивали струей холодного воздуха в течение 5-10 мин.

Тест «Растворение» проводили на приборе «вращающаяся корзинка» при частоте вращения 100 об/мин. В качестве среды растворения использовали 500 мл 0.5 % раствора натрия карбоната. Через 45 мин с момента включения прибора отбирали пипеткой 2 порции, по 5 мл каждая, раствора, переносили их в мерные колбы вместимостью по 25 мл каждая и доводили диметилформамидом (ДМФА) до метки. Через 15 мин измеряли оптическую плотность раствора на фотоколориметре.

Концентрацию кверцетина, перешедшего в раствор, определяли по калибровочному графику, построенному по растворам с известной концентрацией кверцетина.

Для контроля герметичности отбирали 10 капсул, помещали их в бюкс с 20 мл гексана, выдерживали 30 мин, затем раствор сливали в стакан, высушенный до постоянного веса, бюкс с капсулами промывали 2 порциями, по 5 мл каждая, гексана, смывы присоединяли к раствору. Содержимое стакана осторожно упаривали под вакуумом досуха и взвешивали. Масса остатка не должна превышать 0.1 % массы капсул.

Подлинность «Силицетина» определяли следующим образом.

1. Содержимое 1 капсулы растворяли в 5 мл смеси ДМФА - метиленхлорид (1:1), 5 мкл полученного раствора наносили на ТСХ-пластину «Sorbfil UV-254» и хроматографировали в системе растворителей этилацетат - метанол - вода (100:16.5:13.5). Когда фронт растворителей проходил 10 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры и проявляли в парах аммиака. Кверцетин должен обнаруживаться в виде желто-коричневого пятна с R_f около 0.85.

2. Капсулу промывали 5 мл метиленхлорида, полученный раствор выпаривали досуха, к остатку прибавляли 6 мл гексана и фильтровали через бумажный фильтр. 1 мл фильтрата помещали в мерную колбу, осторожно упаривали под вакуумом, далее поступали, как описано в методике определения жирнокислотного состава масла, начиная со слов «...прибавляли 0.5 мл эфира...».

Для количественного определения кверцетина содержимое капсулы переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл с помощью 5 мл смеси ДМФА - метиленхлорид (1:1) и доводили объем раствора той же смесью растворителей до метки. Пипеткой отбирали 0.5 мл полученного раствора, помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 2 мл 2 % раствора диэтиламина в смеси ДМФА - метиленхлорид (1:1) и доводили объем раствора той же смесью растворителей до метки. Через 15 мин измеряли оптическую плотность раствора на фотоколориметре при длине волны 400 нм. Содержание кверцетина в капсуле рассчитывали по калибровочному графику.

Однородность содержания действующего вещества в капсулах определяли по методике [2].

Таблица 1

Качественные и количественные показатели качества масел расторопши, полученных различными способами

Показатели качества	Масло, полученное холодным прессованием (масло 1)	Масло, полученное экстракцией хладоном-12 (масло 2)	Масло, полученное экстракцией хладоном-22 (масло 3)
внешний вид	маслянистая жидкость желтого цвета, с небольшим осадком	маслянистая жидкость желтого цвета с зеленоватым оттенком, прозрачная	
вязкость, мПа·с (при температуре 20 °С)	79.3	55.7	54.9
показатель преломления	1.473	1.473	1.472
плотность, г/см ³	0.912	0.911	0.911
жирнокислотный состав, %:			
- пальмитиновая	6.84	7.44	6.57
- пальмитолеиновая	0.60	0.65	0.29
- стеариновая	5.54	4.12	4.53
- олеиновая	33.35	19.05	20.80
- линолевая	41.72	55.35	58.25
- линоленовая	2.92	4.60	2.10
- арахидовая	3.82	2.52	3.12
- гондоевая	0.99	1.06	1.06
- бегеновая	2.68	1.95	2.57
- лигноцеридовая	0.75	0.55	0.71
сумма токоферолов, %	0.382	0.397	0.405
фитостеролы, %	0.774	0.720	0.737
кислотное число	4.07	4.40	4.25
перекисное число	29.42	2.34	2.21
число омыления	171.5	172.1	172.7
йодное число	81.78	91.32	99.19
микробиологическая чистота:			
- бактерий, КОЕ/г	1340	60	20
- грибов, КОЕ/г	190	30	10
- наличие Enterobacteriaceae	не обнаруж.	не обнаруж.	не обнаруж.
выход от массы сырья, %	8-15	25-27	27-31

Результаты и их обсуждение

При разработке технологии препарата «Силицетин» на стадии получения масла из семян расторопши нами было установлено, что его выход при экстракции хладоном-12 и хладоном-22 составлял (25-32) % от массы сырья, которое при этом практически полностью обезжиривалось, что дает возможность ускорить процесс выделения силимарина при дальнейшей переработке шрота. Кроме того, микробиологическая контаминация данного масла была значительно ниже, чем при холодном прессовании (Табл. 1).

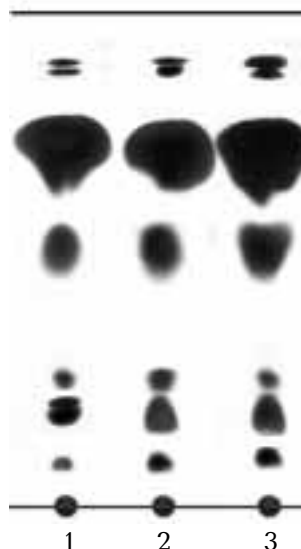
Исследования основных физико-химических характеристик масел, получаемых различными способами, показали, что вязкость масла 1 приблизительно в 1.5 раза выше, чем масел 2 и 3 (Табл. 1), что можно объяснить наличием определенного количества сопутствующих высокомолекулярных соединений (ВМС), переходящих в масло при прессова-

нии сырья. В то же время плотности и показатели преломления всех исследуемых образцов практически не отличались друг от друга.

Анализ жирнокислотного состава показал, что основным компонентом масел расторопши (1 – 3) является комплекс полиненасыщенных жирных кислот: линолевая (41 – 58 %), олеиновая (20 – 42 %), линоленовая (3 – 4.5 %), соотношение которых в образцах (1 – 3) варьируют. Процентное содержание остальных кислот практически не зависит от способа получения. Наличие заметного количества арахидовой и бегеновой кислот (до 4 %) может использоваться для идентификации масла расторопши (Табл. 1).

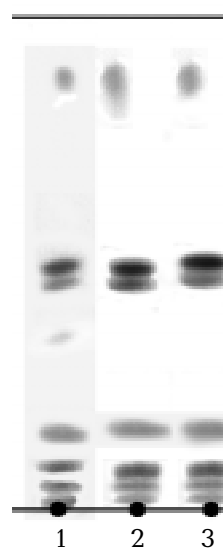
Хроматографические исследования масел и неомыляемой фракции методом ТСХ (Рис. 1, 2) свидетельствуют о незначительных различиях в качественном составе масел (1 – 3).

Рисунок 1



Хроматограмма образцов масла расторопши (1–3) в системе растворителей гексан -диэтиловый эфир – кислота муравьиная (80:20:2)

Рисунок 2



Хроматограмма неомыляемой фракции образцов масла расторопши (1–3) с использованием в качестве подвижной фазы бензола

Таблица 2
Показатели качества препарата «Силицетин»

Показатели	Допустимые нормы	Значение показателя по сериям			
		1	2	3	4
средняя масса капсул, г	0.3062 – 0.3558	0.3305	0.3310	0.3312	0.3311
однородность массы, ± %	7.5	6.27	6.31	7.16	6.57
распадаемость, мин	15	11.2	10.4	12.5	10.7
растворение, %	75 – 115	80.4	85.6	78.2	86.1
герметичность	+*	+	+	+	+
подлинность: - кверцетин	пятно на хроматограмме ГЖХ	+	+	+	+
- ж/к состав масла		+	+	+	+
количественное содержание кверцетина, г	0.02775 – 0.03225	0.0291	0.0307	0.0289	0.0304
однородность содержания действующего вещества (кверцетин), ± %	15 %	5.2	7.5	6.0	5.1

* - соответствует требованиям

Содержание токоферолов и фитостеролов во всех образцах масла находится практически на одном уровне (Табл. 1).

При исследовании количественных показателей масел (1-3) было установлено, что их числа омыления и кислотные числа отличались незначительно, в то время как перекисное число масла 1 было намного выше, чем у масла 2 и 3 (Табл. 1). Это может объясняться присутствием гидролитических и окислительных ферментов, попадающих в масло в процессе прессования сырья. Кроме того,

масла 2 и 3 характеризовались более высоким йодным числом.

Масло 2, полученное экстракцией хладон-12, не представляет интереса для дальнейших разработок, так как использование хладона-12 ограничено рамками Монреальского протокола. Учитывая это, для дальнейших исследований нами было использовано масло 3.

Основные качественные и количественные характеристики препарата «Силицетин» представлены в Табл. 2.

Как видно из Табл. 2, различные серии капсул «Силицетин» характеризуются стабильными показателями качества.

Выводы

Исучен качественный и количественный состав масла расторопши, выделенного из сырья различными способами.

Разработаны методики анализа препарата «Силицетин», представляющего собой твердые желатиновые капсулы, заполненные суспензией кверцетина в масле расторопши.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко Л.Т., Кириянов А.А., Перельсон М.Е. Хроматографический метод количественного определения силибина в плодах *Silybum marianum* L. // Хим.-фармац. журн. - 1980. - № 4. - С. 57-60.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - 556 с.
3. К вопросу о методах стандартизации рыбьего жира. Определение жирнокислотного состава и количественного содержания витамина D₃ в рыбьем жире / Котова Э.Э., Зинченко А.А., Куликов А.Ю. и др. // Фармаком. - 2002. - № 2. - С.83-91.
4. Лагазидзе Л.С., Муравьева Д.А., Бостоганашвили В.С. Содержание фармакологически активных веществ в жирном масле мякоти плодов облепихи, произрастающей в Грузии // Хим.-фармац. журн. - 1984. - № 6. - С. 713-717.
5. Машковский Г. Д. Лекарственные средства: В 2 т. - Т. 2. - М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2000.
6. Пат. 2014840 Российская Федерация, МКИ А61К 35/78. Средство, обладающее ранозаживляющим и гепатопротекторным действием / Лебедев А.А., Симерзина Л.В., Лебедев П.А. (Россия). - Заявл. 30.03.92; Опубл. 30.06.94, Бюл. № 12. - 4 с.
7. Пат. 63301А. Україна, МКВ А61К35/78. Гепатопротекторний лікарський засіб „Силіцетин” (Варіанти) / Дем'яненко В.Г. (Україна), Бодрі Хамам Саліх (Судан), Деримедвідь Л.В., Дрогозов С.М., Кисличенко В.С., Дем'яненко Д.В. (Україна). - Заявл. 31.03.03; Опубл. 15.01.04 // Промислова власність. - №1. - 4 с.
8. Сокольская Т. А. Комплексная переработка плодов расторопши пятнистой и создание на ее основе препарата «Силимар» // Хим.-фармац. журн. - 2000. - № 9. - С. 27-30.
9. Cade D., Cole E.T., Mayer J-Ph., Wittwer F. // Acta Pharm. Technol.- 1987. - Vol. 33, No. 2. - P. 97-100.
10. Pat. WO 0113930 A1 France, IPC A61K35/78. Utilisation dietetique des huiles de cynara cardunculus et de silybum marianum / Jean Julia (France). - № 9902046; Filed 26.08.99; Publ. 01.03.2001. - 11 p.

Резюме

Дем'яненко В.Г., Бодрі Хамам Саліх, Зінченко О.А., Дем'яненко Д.В.

Розробка методик контролю якості препарату «Силіцетин»

Проведено дослідження якісного та кількісного складу олії, виділеної з насіння *Silybum marianum* L. різними способами. Розроблено методики контролю якості нового лікарського препарату рослинного походження «Силіцетин», що являє собою тверді желатинові капсули, заповнені суспензією кверцетину в олії розторопші плямистої. Результати досліджень, проведених на різних серіях препарату, характеризуються досить високою відтворюваністю.

Summary

Demyanenko V.G., Bodri Khamam Salykh, Zinchenko A.A., Demyanenko D.V.

Development of Silycetin drug quality control procedures

The study of qualitative and quantitative composition of oil isolated from the seeds of milk thistle (*Silybum marianum* L.) by various methods was carried out. The quality control procedures for Silycetin, new medicinal agent of plant origin in hard gelatinous capsules filled with suspension of quercetin in milk thistle oil were developed. The results of studies performed on different batches of product are characterized by sufficient reproducibility.

Дем'яненко Віктор Григорьевич. Д.фарм.н. (1991). Професор (1992) кафедри заводської технології лікарств (ЗТЛ) Національного фармацевтичного університету (НФаУ).

Бодри Хамам Саліх. Аспірант кафедри ЗТЛ НФаУ (2001).

Зинченко Александр Анатоліевич. (р. 1956). Окончил Харьковский государственный университет (1983). Ст. науч. сотр. лаборатории фармализа ГП НЭФЦ (с 1998).

Дем'яненко Дмитрій Вікторович. Ассистент кафедри ЗТЛ НФаУ (2002).

Готові лікарські засоби

УДК 615.275.014.2

Шитєєва Т.А.

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів»

Розробка складу та технології трансдермальної терапевтичної системи проти запальної дії

Проведено поетапні дослідження композиційних сумішей із диклофенаком натрію, що містять структуроутворювачі, пластифікатори, наповнювачі та адгезивні компоненти у різних співвідношеннях. Вивчено *in vitro* процеси вивільнення та проникності диклофенаку натрію із ТТС крізь різні мембрани. Визначено оптимальний склад компонентів матричної основи ТТС. Розроблено технологію одержання ТТС матричного типу проти запальної дії.

Лікування запальних захворювань опорно-рухової системи залишається однією з найактуальніших проблем сучасної медицини. При вирішенні цієї проблеми у клінічній та амбулаторній практиці широке застосування знайшли нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ), зокрема, диклофенак натрію [1-3].

Однак, лікарські засоби з диклофенаком натрію, які представлені в медичній практиці в різних формах, мають побічні ефекти, характерні для НПЗЗ. Застосовувані в локальній терапії мазі та гелі зменшують ризик побічних ефектів лікарської речовини (ЛР), але не мають пролонгованої дії.

Зменшення ефектів побічної дії з одночасною пролонгацією дії можливо завдяки використанню диклофенаку натрію у формі трансдермальної терапевтичної системи (ТТС).

ТТС - нова лікарська форма, яка дозволяє вводити ЛР в організм людини крізь шкіру із заданою швидкістю достатньо тривалий час. При цьому спостерігається як загальносистемна, так і місцева дія ЛР [4-6].

Ефективність ТТС визначається збалансованістю швидкості процесу вивільнення з неї ЛР та швидкості процесу проникності ЛР крізь шкіру, які залежать від концентрації діючої речовини, властивостей допоміжних матеріалів, які входять до складу матриці, та типу її конструкції [6].

Одним із різновидів ТТС є матричні системи, в яких ЛР розподіляється в матриці-носії, яка наноситься на непроникну для ЛР підложку. Адгезивні речовини, що забезпечують належну фіксацію системи на шкірі, можуть бути нанесені ззовні системи або входити безпосередньо до складу матриці [7, 8].

Найбільш економічно вигідним і перспективним є створення матричної ТТС на основі

гідрофільних матриць, які забезпечують високу біодоступність та ефективність дії [7-9]. Розробка такої ТТС потребує проведення комплексу наукових досліджень, до яких належать вивчення фізико-хімічних властивостей ЛР, вибір оптимального складу матриці на основі вивчення процесів проникнення та вивільнення ЛР *in vitro*, фармакологічні та фармакокінетичні дослідження препарату обраного складу та розробка технології.

Метою нашої роботи була розробка науково обґрунтованого складу та технології одержання лікарського засобу проти запальної дії з диклофенаком натрію у формі ТТС.

Об'єкти та методи дослідження

Для створення гідрофільної матриці з певними технологічними та адгезивними властивостями досліджували матричні основи з диклофенаком натрію, які готували з використанням таких допоміжних речовин у різних співвідношеннях: структуро- та плівкоутворюючі полімери (метилцелюлоза (МЦ), натрій карбоксиметилцелюлоза (Na-КМЦ), полівініловий спирт (ПВС), желатин); розчинники (спирт етиловий, пропіленгліколь, вода очищена); пластифікатори (гліцерин, кислота лимонна, поліетиленоксид 400 (ПЕО 400), твін-80); наповнювачі (діоксид титану, окис цинку, крохмаль картопляний, каолін); адгезив (водний розчин поліакрилату натрію); кератолітичний засіб (кислота саліцилова) [10, 11]. Матричні основи готували як на основі одного структуроутворюючого полімеру, так і поєднуючи в одному складі декілька речовин при перемішуванні їх з іншими компонентами до одержання однорідної маси. Диклофенак натрію вводили в матричну основу в пропіленгліколі в концентрації 3 %.

Зразки ТТС для досліджень готували нанесенням приготованих матричних основ на

смугу ацетатної тканини (підложка) за допомогою лабораторного пристрою для нанесення мас ракельним способом.

Зразки ТТС візуально оцінювали за показниками: рівномірність нанесеного шару, сумісність із підложкою, відсутність промокання підложки. Порівняльну оцінку адгезивних властивостей зразків при аплікації на шкіру оцінювали відомим [12, 13] сенсорним методом за 5-бальною шкалою.

Дослідження кінетики вивільнення диклофенаку натрію зі зразків ТТС *in vitro* проводили при температурі (37 ± 1) °С методом діалізу крізь целофан [14]. Як акцепторне середовище використовували воду очищену. Визначали концентрацію диклофенаку натрію в діалізаті.

Дослідження кінетики сумарного процесу вивільнення та проникності диклофенаку натрію проводили крізь «штучний шкіряний бар'єр» (бішарова гідрофільно-ліпофільна мембрана) на імітаторі абсорбції типу SM 16750 фірми «Sartorius» (Німеччина) [15, 16]. Використовувана бішарова мембрана за фізико-хімічною природою максимально наближена до властивостей біомембран першого типу (епідерміс шкіри, епітелій шлунково-кишкового тракту або ниркових каналців, гематоенцефалічний бар'єр і бар'єр між кров'ю та спинномозковою рідиною), тобто структур, що визначають біодоступність ЛР [17]. Як акцепторний розчин використовували фосфатний буферний розчин рН 7.4.

Кількісне визначення диклофенаку натрію у пробах діалізату проводили спектрофотометричним методом на СФ-46 за довжини хвилі 276 нм.

Результати та їх обговорення

Із досліджених більше 100 композицій матричних основ із диклофенаком натрію за результатами оцінки технологічних та адгезивних властивостей було відібрано 7 складів, які містять желатин, Na-КМЦ, ПВС із желатином, поліакрилат натрію та інші речовини (Табл. 1).

Дослідження кінетики вивільнення диклофенаку натрію проведені на зразках ТТС обраних складів.

На основі одержаних результатів (Табл. 2, Рис.1) можливо простежити вплив кожної допоміжної речовини на вивільнення диклофенаку натрію.

Найгірший результат одержано для матричної основи, що містить Na-КМЦ (№ 4). При заміні Na-КМЦ на суміш ПВС та желатину (№ 3) вивільнення диклофенаку натрію покращується. Матрична основа, що містить 5 % желатину, 10 % поліакрилату натрію (№ 2) та наповнювач оксид цинку, показує ще краще вивільнення. Порівняння результатів вивільнення з основ (№ 2-3) свідчить про те, що наявність ПВС уповільнює вивільнення диклофенаку натрію.

Заміна у складі (№ 2) наповнювача оксиду цинку на крохмаль (№ 1) призводить до покращення вивільнення. При цьому концентрація диклофенаку натрію в діалізаті (Табл. 2) на 5 годину вивільнення збільшується на 20 %, що свідчить про позитивний вплив крохмалю.

Матричні основи (№ 5, 6, 7), що відрізняються від інших збільшеним вмістом желатину (близько 8 %) та зменшеною кількістю поліакрилату натрію (близько 5 %), показали найкраще вивільнення диклофенаку натрію.

Таблиця 1

Склад матричних основ із диклофенаком натрію

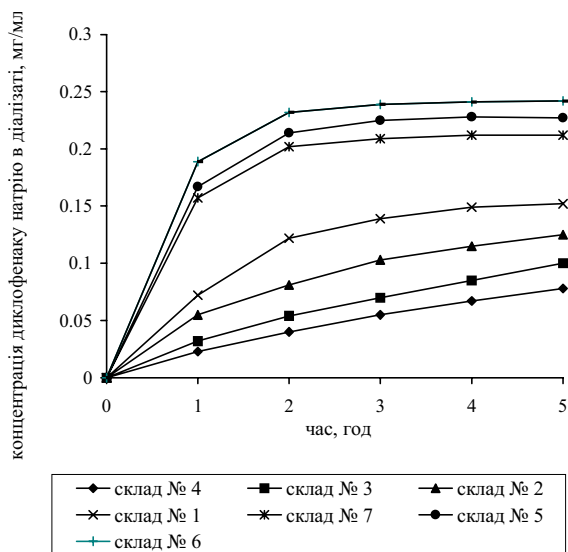
Інгредієнти	Склад досліджуваних матричних основ, %						
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
диклофенак натрію	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Na-КМЦ	-	-	-	4.0	-	-	-
ПВС	-	-	5.5	-	-	-	-
желатин	5.0	5.2	4.8	-	7.2	8.0	7.2
поліакрилат натрію	8.5	10.0	8.2	6.8	4.8	5.0	4.8
пропіленгліколь	38.0	35.0	35.0	34.0	34.0	34.0	36.0
спирт етиловий	2.0	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5
окис цинку	-	3.0	3.0	5.0	-	-	-
крохмаль картопляний	3.7	-	-	-	3.5	3.5	3.0
кислота лимонна	1.0	2.0	1.6	1.2	2.0	-	-
кислота салцилова	-	-	-	-	-	0.2	-
вода очищена	38.8	39.3	36.9	44.0	43.5	44.3	43.5

Таблиця 2

Вивільнення диклофенаку натрію із ТТС різного складу

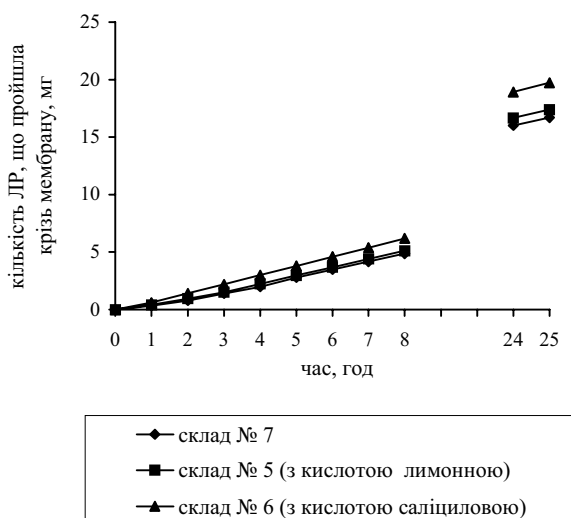
Склад	Концентрація диклофенаку натрію в діалізаті (мг/мл), визначена через фіксовані проміжки часу (год)				
	1	2	3	4	5
№ 1	0.072 ± 0.006	0.122 ± 0.004	0.139 ± 0.009	0.149 ± 0.008	0.150 ± 0.005
№ 2	0.055 ± 0.003	0.081 ± 0.005	0.103 ± 0.007	0.115 ± 0.004	0.125 ± 0.006
№ 3	0.032 ± 0.002	0.054 ± 0.003	0.073 ± 0.005	0.085 ± 0.006	0.112 ± 0.004
№ 4	0.024 ± 0.001	0.042 ± 0.002	0.055 ± 0.002	0.067 ± 0.004	0.078 ± 0.003
№ 5	0.167 ± 0.005	0.214 ± 0.003	0.225 ± 0.004	0.228 ± 0.005	0.227 ± 0.006
№ 6	0.189 ± 0.004	0.232 ± 0.006	0.240 ± 0.005	0.241 ± 0.005	0.242 ± 0.006
№ 7	0.157 ± 0.004	0.202 ± 0.004	0.209 ± 0.005	0.212 ± 0.004	0.211 ± 0.005

Рисунок 1



Вивільнення диклофенаку натрію із ТТС різного складу

Рисунок 2



Кінетика подачі диклофенаку натрію крізь «штучний шкіряний бар'єр»

Порівняння вивільнення з матричних основ схожих складів № 1 та № 5 також свідчить, що збільшення кількості поліакрилату натрію (№ 1) уповільнює цей процес, що можна пояснити властивістю поліакрилату натрію утворювати плівку при висушуванні.

Аналізуючи результати, наведені в Табл. 2, слід відмітити, що вивільнення диклофенаку натрію з матричних основ № 5 - 7 здійснюється з постійною швидкістю, починаючи із 3 години від початку експерименту.

Таким чином, проведені дослідження вивільнення диклофенаку натрію *in vitro* дозволили оптимізувати склад матричної основи та встановити наступне:

- використання Na-КМЦ та ПВС у складі матричної основи неефективно;

- доцільне використання желатину (7 — 8 %), поліакрилату натрію (5 %), пропіленгліколю (34 — 36 %), крохмалю (3 — 3.5 %).

Дослідження кінетики сумарного процесу вивільнення та проникності, проведені на зразках ТТС складів № 5 - 7 (Рис. 2), показали, що вивільнення диклофенаку натрію з усіх зразків здійснюється з постійною швидкістю із пролонгацією дії диклофенаку натрію протягом більше 24 год.

Швидкості потоків диклофенаку натрію з матриці на основі желатину з додаванням кислоти лимонної (№ 5) та без кислоти (№ 7) практично співпадають, а введення кислоти саліцилової незначно підвищує швидкість потоку диклофенаку натрію (№ 6).

Остаточний склад ТТС із диклофенаком натрію було визначено на основі фармакологічних досліджень, проведених на кафедрі фармакології Воронежського медичного інституту під керівництвом проф. К.М. Резнікова. За оцінкою специфічної протизапальної активності та анальгетичної й антиексудативної дій зразків ТТС із диклофенаком натрію, при-

готованих із визначених матричних основ (№ 5 — 7) було показано, що найбільша протизапальна активність визначена у зразків ТТС, що містять у складі кислоту саліцилову або лимонну.

Фармакокінетичні дослідження ТТС протизапальної дії проведені в лабораторії фармакокінетики ДП ДНЦЛЗ під керівництвом к.фарм.н. А.А. Резніченко. Фармакокінетичними дослідженнями встановлено, що нова лікарська форма диклофенаку натрію забезпечує рівномірне тривале надходження ЛР в організм тварини протягом 24 год та більше, що корелює з даними вивільнення *in vitro*.

У результаті досліджень, пов'язаних із розробкою технології одержання ТТС, були визначені окремі стадії технологічного процесу: температурний режим одержання матричної основи; склад «грунтової» й умови її нанесення на ацетатну тканину (підложку); умови нанесення матричної основи на підложку із «грунтовою» (товщина шару, швидкість руху підложки, температура та час сушіння підложки із шаром матричної основи); умови сполучення підложки із захисним покриттям; умови розрізання підложки із шаром висушеної матричної основи на прямокутники певного розміру та пакування ТТС в пакети із цефлену.

Результати проведених досліджень були покладені в основу розробки та впровадження у виробництво на ТОВ «ФК «Здоров'я» нової лікарської форми — ТТС матричного типу з диклофенаком натрію «Диклодерм» (Р.05.99/00613).

Висновки

1. На основі дослідження технологічних та адгезивних властивостей різних складів було обрано перспективні склади матричних основ для створення ТТС із диклофенаком натрію.

2. На основі проведених *in vitro* досліджень і результатів фармакологічного та фармакокінетичного вивчення науково обґрунтований оптимальний склад матричної ТТС. Показано, що застосування диклофенаку натрію у формі ТТС забезпечує рівномірне та тривале надходження диклофенаку натрію крізь шкіру протягом 24 год.

4. Розроблено умови проведення окремих стадій та технологія одержання ТТС матричного типу з диклофенаком натрію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лекарственная терапия воспалительного процесса: Экспериментальная и клиническая фармакология про-

тивовоспалительных препаратов / Под ред. Сигидина Я.А., Шварца Г.Я., Арзамасцева А.П., Либермана С.С. - М.: Медицина, 1988. - 240 с.

2. Зупанец І.А., Бездетко Н.В., Безуглая Н.П. Фармацевтическая опека. Симптоматическое лечение суставной и мышечной боли // Клінічна фармація. — 2002. - Т. 6, № 3. - С. 22-28.

3. Насыбулина Н. М. Нестероидные противовоспалительные препараты и их лекарственные формы (обзор) // Хим.-фармац. журн. — 1999. - Т. 33, № 2. — С. 30—35.

4. Chien Y.W. Development of Transdermal Drug Delivery Systems // Drug Developm. and Ind. Pharm. - 1987. - Vol. 13, No. 4-5. - P. 589-651.

5. Губина Т.Н., Назарова Е.С., Шитеева Т.А., Вербова Ю.М., Ковалев И. П. Трансдермальные лекарственные средства в Украине: итоги и перспективы разработок ГНЦЛС // Фармаком. — 1999. - № 3-4. - С. 65-70.

6. Губина Т.Н., Ковалев И.П. Трансдермальные терапевтические системы // Технология и стандартизация лекарств. - Харьков: ООО "Рирег". - 1996. - С. 749 - 777.

7. Васильев А.Е., Краснюк И.И., Равикумар С., Тохмахчи В.Н. Трансдермальные терапевтические системы доставки лекарственных веществ (обзор) // Хим.-фармац. журн. — 2001. — Т. 35, № 11. — С. 29-42.

8. Малхазов Л.Б., Фельдштейн М.М., Васильев А.Е. Кинетика подачи пропранолола из трансдермальных терапевтических систем «Проперкутен» *in vitro* // Хим.-фармац. журн. — 1993. — Т. 27, № 10. - С. 28-32.

9. Васильев А.Е., Краснюк И.И., Равикумар С., Максимова О.О. Трансдермальные терапевтические системы с индометацином // Хим.-фармац. журн. — 2001. - Т. 35, № 10. - С. 51-52.

10. Допоміжні речовини та їх застосування в технології лікарських форм: Довідковий посібник / Ф. Жоголо, В. Возняк, В. Попович, Я. Богдан - Львів: Львівський держ. мед. ун-т, 1996. - 95 с.

11. Полимеры в фармации / Под. ред. А.И. Тенцовой, М.Т. Алюшина. - М.: Медицина, 1985. - 128 с.

12. Minghetti P., Cilurzo F., Montanari L. Evaluation of Adhesive Properties of Patches Based on Acrylic Matrices // Drug Dev. and Ind. Pharm. - 1999. — Vol. 25, No.1. — P. 1-6.

13. Kuroda M. Texture Profile for Molded Poullices // Chemical Pharmacology Bulletin. — 1986. — Vol. 34, No. 6. - P. 2568-2577.

14. Азимова Н.А., Миралимов М.М. Высвобождение никотиновой кислоты из накожной терапевтической системы // Хим.-фармац. журн. — 2001. — Т. 35, № 2. — С. 49-50.

15. Шитеева Т.А., Назарова Е.С., Губина Т.Н., Вербова Ю.М. Исследование проницаемости действующих веществ через «искусственный кожный барьер» // Научные направления в создании лекарственных средств в фармацевтическом секторе Украины: Тез. докл. республ. научн. конф. — Харьков: Карат, 2000. - С. 66.

16. Resorptions modell nach Stricker. Anleitung fur Einsatz und Auswertung // Sartorius GmbH., «S. 1.» — 1984. — 21 p.

17. Альберт А. Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии: Пер. с англ.: В 2 т. - М.: Медицина, 1989.

Резюме

Шитеева Т.А.

Разработка состава и технологии трансдермальной терапевтической системы противовоспалительного действия

Проведены поэтапные исследования композиционных смесей с диклофенаком натрия, содержащих струк-

турообразователи, пластификаторы, наполнители и адгезивные компоненты в разных соотношениях. Изучены *in vitro* процессы высвобождения и проницаемости диклофенака натрия из ТТС через различные мембраны. Определен оптимальный состав компонентов матричной основы ТТС. Разработана технология получения ТТС матричного типа противовоспалительного действия.

Summary

Shiteyeva T. A.

Development of composition and technology of transdermal therapeutic system with anti-inflammatory action

The investigations of composition of mixtures with diclofenac sodium, containing the structure builders, plasti-

cizers, fillers and adhesive components in different ratio have been carried out. The processes of diclofenac sodium release from the therapeutic transdermal systems (TTS) and penetration through diverse membranes *in vitro* have been studied. An optimum composition of a matrix TTS base has been studied. The technology TTS of matrix type with anti-inflammatory action has been developed.

Шитеєва Тетяна Олексіївна. Закінчила Харківський політехнічний інститут (1987). Наук. співр. сектору трансдермальних терапевтичних засобів лабораторії фізико-хімічних процесів ДП ДНЦЛЗ.

УДК 615.454.2.012

Довга І.М., Козлова Н.Г., Замараєва О.Е., Романова Я.Ю.
Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів»

Вивчення реологічних властивостей супозиторіїв з амінокапроною кислотою

Вивчено реологічні властивості супозиторіїв з амінокапроною кислотою 0.5 г та поліетиленоксидної основи. Вивчено вплив субстанції на реологічні властивості супозиторіїв. Досліджено залежність структурної в'язкості від градієнта швидкості зсуву, температури та часу перемішування. Показано, що структурна в'язкість супозиторіїв з амінокапроною кислотою при зростанні швидкості зсуву та температури зменшується. Перемішування супозиторної маси з частотою обертання мішалки 0.9 c^{-1} протягом 1 год при температурі $60 \text{ }^\circ\text{C}$ забезпечує одержання супозиторіїв належної якості. Результати досліджень використані при розробці технології супозиторіїв з амінокапроною кислотою 0.5 г для дітей.

Супозиторії як всі структуровані системи мають певні консистентні властивості. Структурно-механічні або реологічні властивості є найважливішою характеристикою, що визначає стійкість зв'язно-дисперсних систем. Вивчення цих властивостей має важливе значення при оптимізації технологічного процесу [1, 2, 3, 7].

Для визначення параметрів технологічного процесу приготування супозиторіїв, однорідності маси, однорідності вмісту, швидкості та повноти вивільнення лікарської речовини слід знати тип течії супозиторної маси та ступінь її тиксотропності.

Метою даної роботи було вивчення реологічних властивостей супозиторіїв з амінокапроною кислотою 0.5 г для дітей.

Об'єкти та методи дослідження

Об'єктом дослідження були супозиторії з амінокапроною кислотою 0.5 г для дітей та поліетиленоксидна основа для цих супозиторіїв.

У результаті проведеного комплексу науково-дослідних робіт із вибору складу супозиторіїв з амінокапроною кислотою розроблена оптимальна композиція допоміжних

речовин та обгрунтований оптимальний розмір часток лікарської речовини [8]. У даній роботі нами були вивчені реологічні властивості супозиторіїв з амінокапроною кислотою розробленого складу.

Вимірювання реологічних параметрів супозиторної основи та супозиторної маси проводили на ротаційному віскозиметрі «Реотест-2» (Німеччина) із коаксіальними циліндрами за методикою Державної Фармакопеї України (2.2.10) [4, 6]. Реологічні властивості систем визначали при різних значеннях температури в інтервалі від $46 \text{ }^\circ\text{C}$ до $75 \text{ }^\circ\text{C}$, за яких супозиторна основа та супозиторна маса знаходяться у рідкому стані.

Визначення стійкості до руйнування супозиторіїв з амінокапроною кислотою проводили на приборі SBT фірми «Erweka» (Німеччина) за методикою Європейської Фармакопеї (2.9.24) [5, 9].

Температуру тверднення та розпадання супозиторіїв, що досліджуються, визначали за методиками Державної Фармакопеї України (2.2.18, 2.9.2) [4].

Визначення однорідності вмісту супозиторної маси з амінокапроною кислотою проводили в інтервалі температур ($46\text{-}60 \text{ }^\circ\text{C}$

в термостатованій ємності при перемішуванні мішалкою з частотою обертання 0.9 c^{-1} протягом 60 хв. (Термостатування здійснювали за допомогою термостату U 10 із точністю $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$.) Проби супозиторної маси відбирали через 10 хв із верхнього та нижнього шарів ємності.

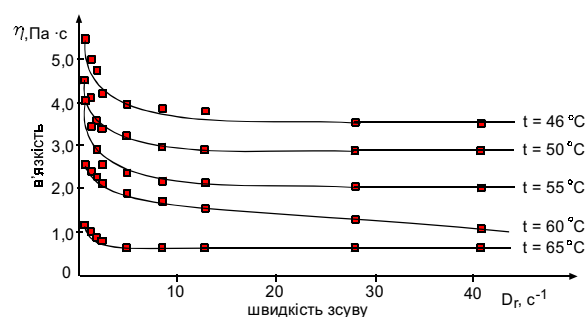
Визначення кількісного вмісту кислоти амінокапронової в супозиторній масі проводили методом неводного титрування. 1 мл 0.1 М розчину кислоти хлорної відповідає 0.01312 г $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ (кислоти амінокапронової), якої, рахуючи на середню масу одного супозиторія, має бути від 0.475 г до 0.525 г.

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження залежності структурної в'язкості від градієнта швидкості зсуву для супозиторіїв з амінокапроновою кислотою 0.5 г, виготовлених на поліетиленоксидній (ПЕО) основі, що складається з композиції ПЕО 1500 і ПЕО 400 у співвідношенні 80:20, при різних значеннях температури в інтервалі від $46 \text{ }^\circ\text{C}$ до $65 \text{ }^\circ\text{C}$ показало, що в'язкість супозиторної маси зменшується із зростанням градієнта швидкості зсуву. Результати досліджень приведені на Рис. 1. Як видно з рисунка, структурна в'язкість супозиторної маси з амінокапроновою кислотою при температурі $46 \text{ }^\circ\text{C}$ у діапазоні градієнта швидкості зсуву від 0.5 c^{-1} до 27.3 c^{-1} зменшується в 1.55 рази, а в діапазоні градієнта швидкості зсуву від 27.3 c^{-1} до 40.5 c^{-1} — в 1.1 рази. Аналогічна залежність структурної в'язкості від градієнта швидкості зсуву спостерігається і за інших температур, що пов'язано з типом течії маси, що досліджується.

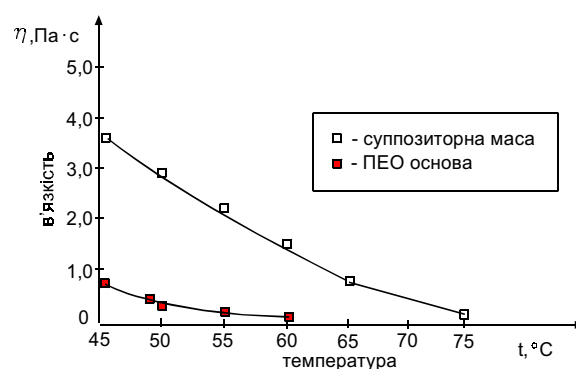
Вивчення залежності структурної в'язкості супозиторної маси з амінокапроновою кислотою від температури показало, що при підвищенні температури від $46 \text{ }^\circ\text{C}$ до $65 \text{ }^\circ\text{C}$ значення структурної в'язкості супозиторної маси, яка досліджується, при градієнті швидкості зсуву 27.3 c^{-1} зменшується майже у

Рисунок 1



Залежність структурної в'язкості супозиторної маси з АКК від швидкості зсуву

Рисунок 2



Залежність структурної в'язкості супозиторної маси з АКК та ПЕО основи від температури

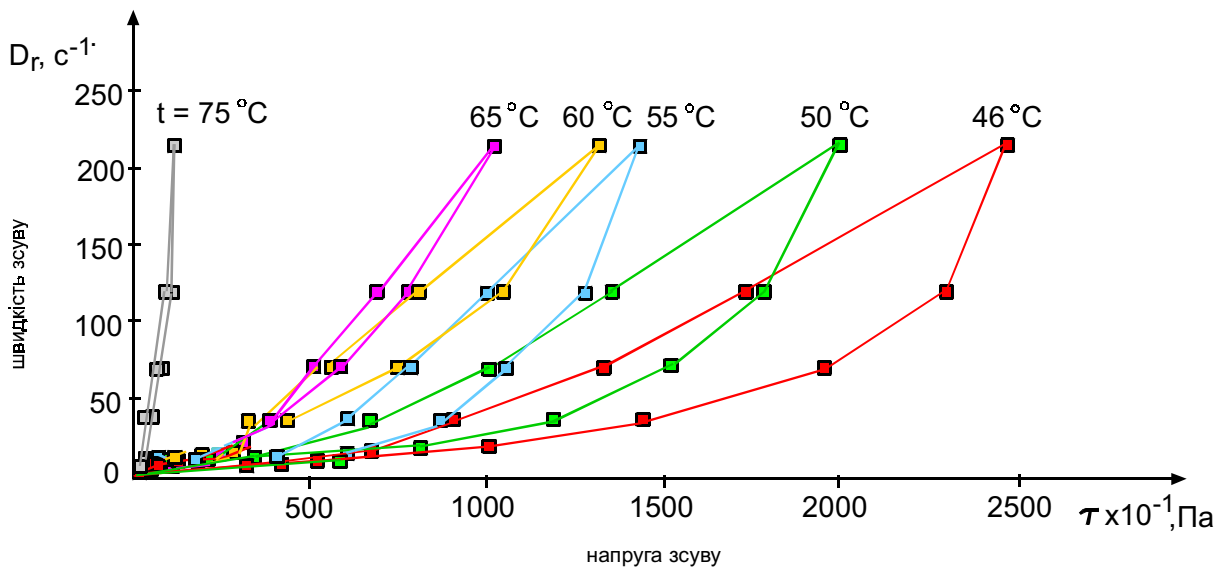
5 разів (Рис. 2). У цьому діапазоні температури досліджувана система знаходиться у стані каламутного гелю. В інтервалі температур від $65 \text{ }^\circ\text{C}$ до $75 \text{ }^\circ\text{C}$ значення структурної в'язкості супозиторної маси з амінокапроновою кислотою при тому ж градієнті швидкості зсуву зменшується у 7 разів, супозиторна маса стає прозорою, що пов'язано із остаточним розплавленням ПЕО 1500. Дослідження структурної в'язкості поліетиленоксидної основи при підвищенні температури від $46 \text{ }^\circ\text{C}$ до $60 \text{ }^\circ\text{C}$ при градієнті швидкості зсуву 27.3 c^{-1} показало, що структурна в'язкість зменшується від $0.81 \text{ Па}\cdot\text{с}$ до $0.08 \text{ Па}\cdot\text{с}$, тобто май-

Таблиця 1

Структурна в'язкість супозиторної основи та супозиторної маси при різних температурах

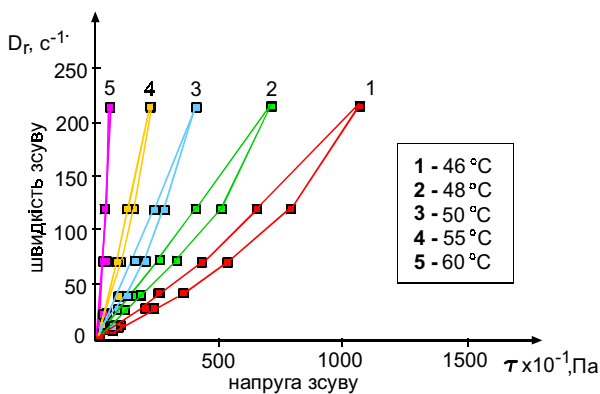
Реопараметри	Показники структурної в'язкості при різних температурах						
	46 $^\circ\text{C}$	48 $^\circ\text{C}$	50 $^\circ\text{C}$	55 $^\circ\text{C}$	60 $^\circ\text{C}$	65 $^\circ\text{C}$	75 $^\circ\text{C}$
супозиторна маса							
η , Па·с ($D_r 27,3 \cdot \text{c}^{-1}$)	3.69	-	2.90	2.20	1.50	0.76	0.10
основа							
η , Па·с ($D_r 27,3 \cdot \text{c}^{-1}$)	0.81	0.49	0.38	0.17	0.08	-	-

Рисунок 3



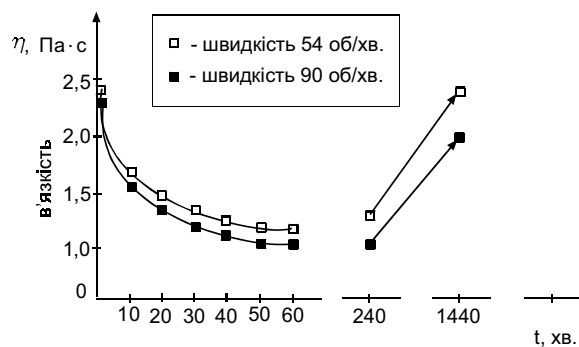
Реограми супозиторної маси АКК при різних температурах

Рисунок 4



Реограми супозиторної поліетиленоксидної основи при різних температурах

Рисунок 5



Залежність структурної в'язкості супозиторної маси від часу перемішування при різних швидкості перемішування

Таблиця 2

Вплив температури та часу перемішування з частотою обертання мішалки 0.9 с⁻¹ на деякі фізичні, фізико-хімічні та фармако-технологічні показники супозиторіїв з кислотою амінокапроною

Температура дозування, °С	Час перемішування, хв	Стійкість до руйнування, г	Температура тверднення, °С	Розпадання, хв
60	10	2600	42.5	14
	30	2200	42.0	12
	60	1800	41.2	10
55	10	3200	43.4	15
	30	2800	43.0	14
	60	2400	42.2	13
50	10	4200	45.0	30
	30	3800	44.5	25
	60	3500	44.2	20

же у 10 разів (Рис. 2). Порівняння залежності структурної в'язкості супозиторної маси й основи від температури показало, що структурна в'язкість супозиторної маси при початковій температурі вимірювання 46 °С значно відрізняється від структурної в'язкості основи, а при максимальній температурі вимірювання 75 °С наближається до структурної в'язкості основи при температурі (55-60) °С (Табл. 1).

Як видно із даних, наведених на Рис. 3, супозиторна маса з амінокапроною кислотою при температурі (46-75) °С має псевдопластичний тип течії. Наявність петель гістерезису свідчить про те, що дисперсні системи, що досліджуються, мають тиксотропні властивості. Реограми, одержані для тих самих супозиторних мас при різних температурах показали, що чим вище температура, тим менша площа петель гістерезису.

Порівняння реограм супозиторної основи і супозиторної маси та значень структурної в'язкості показує, що введення лікарської речовини в основу значно впливає на реологічні параметри (Рис. 2, 3, 4, Табл. 1). Із введенням амінокапронової кислоти в супозиторну основу зростає структурна в'язкість супозиторної маси та підвищується тиксотропність, що пояснюється збільшенням концентрації твердої фази в системі, внаслідок чого зменшується її рухливість. Так, при температурі 60 °С структурна в'язкість супозиторної маси при градієнті швидкості зсуву 27.3 с⁻¹ у порівнянні зі структурною в'язкістю супозиторної основи при тому ж градієнті швидкості зсуву збільшується від 0.08 Па·с до 1.50 Па·с, тобто у 18 разів.

При оптимізації технології приготування супозиторіїв з амінокапроною кислотою не менш важливими показниками є швидкість та час перемішування супозиторної маси. Якщо не враховувати зазначені вище фактори, одержані супозиторії будуть неоднорідними за вмістом через низьку швидкість та недостатній час перемішування або розшаруються і не будуть мати належної форми через руйнування внутрішньої структури поліетиленоксидної основи при високій швидкості та тривалому перемішуванні.

Вплив швидкості та часу перемішування на консистентні властивості вивчали при максимальній температурі 60 °С, за якої супозиторна маса знаходиться у стані гелю та має низьку структурну в'язкість (Рис. 5).

Результати експерименту показують, що при перемішуванні супозиторної маси з час-

тотою обертання мішалки 0.9 с⁻¹ (54 об/хв) за 60 хв структурна в'язкість супозиторної маси зменшується від 2.4 Па·с до 1.3 Па·с і за деякий час (24 год) відновлюється до початкового значення. При збільшенні частоти обертання мішалки до 1.5 с⁻¹ (90 об/хв) за той самий час структура супозиторної маси відновлюється частково. Тому для приготування супозиторної маси з амінокапроною кислотою була вибрана частота обертання мішалки не більше 0.9 с⁻¹.

Також було вивчено вплив часу перемішування з частотою обертання мішалки 0.9 с⁻¹ на стійкість супозиторіїв до руйнування, температуру тверднення та розпадання супозиторіїв, виготовлених при температурах від 60 °С до 50 °С. Результати досліджень наведені в Табл. 2.

Із таблиці видно, що при температурі 60 °С та часі перемішування супозиторної маси від 10 хв до 60 хв стійкість супозиторіїв до руйнування зменшується від 2600 г до 1800 г, температура тверднення - від 42.5 °С до 41.2 °С, час розпадання — від 14 хв до 10 хв. При зниженні температури до (55-50) °С значення фізичних, фізико-хімічних та фармако-технологічних показників супозиторіїв зростають, що пов'язано із відновленням структури та зростанням структурної в'язкості. Результати проведених досліджень показали, що зниження структурної в'язкості при перемішуванні супозиторної маси із частотою обертання мішалки 0.9 с⁻¹ протягом 1 год до 1.3 Па·с дозволяє одержати супозиторії належної форми. Зниження температури дозування супозиторної маси до (50-55) °С також дозволяє одержати супозиторії, які відповідають вимогам ДФУ (2.2.18, 2.9.2) і Європейської Фармакопеї (2.9.24).

Дані досліджень впливу температури та часу перемішування на однорідність вмісту супозиторної маси приведені в Табл. 3.

Із наведених даних видно, що при температурі (46-50) °С супозиторна маса неоднорідна, що пов'язано із високою в'язкістю та ускладненням рівномірного перемішування. При температурі 65 °С супозиторна маса розшаровується і амінокапронова кислота осідає в нижньому шарі ємності. Оптимальними для приготування супозиторної маси є температура (55-60) °С та час перемішування (30-60) хв (у залежності від швидкості дозування, ступеня здрібнення сировини та ін.), які слід підтримувати при приготуванні та дозуванні супозиторіїв з амінокапроною кислотою.

Таблиця 3

Вплив температури та часу перемішування на однорідність вмісту супозиторної маси

Температура, °С	Час перемішування, хв	Кількісний вміст кислоти амінокапронової, рахуючи на середню масу одного супозиторія, г	
		верхній шар	нижній шар
46	10	0.35	0.27
	20	0.40	0.43
	30	0.37	0.36
	40	0.39	0.51
	50	0.61	0.49
	60	0.57	0.42
50	10	0.56	0.41
	20	0.43	0.52
	30	0.45	0.59
	40	0.48	0.56
	50	0.44	0.43
	60	0.56	0.43
55	10	0.37	0.42
	20	0.44	0.43
	30	0.50	0.50
	40	0.49	0.48
	50	0.51	0.49
	60	0.50	0.48
60	10	0.41	0.42
	20	0.47	0.45
	30	0.49	0.50
	40	0.51	0.52
	50	0.50	0.49
	60	0.52	0.48
65	10	0.15	0.60
	20	0.10	0.65
	30	0.08	0.70
	40	0.05	0.08
	50	-	0.90
	60	-	0.95

Таким чином, на процеси структуроутворення при виготовленні супозиторіїв з амінокапроновою кислотою 0.5 г значний вплив має температура, швидкість та час перемішування супозиторної маси.

Висновки

1. Вивчено реологічні властивості супозиторної поліетиленоксидної основи та супозиторіїв з амінокапроновою кислотою при температурі від 46 °С до 75 °С.

2. Вивчено вплив швидкості та часу перемішування супозиторної маси (частота обертання мішалки від 0.9 с⁻¹ до 1.5 с⁻¹, час перемішування - до 60 хв) на її реологічні властивості. Показано, що перемішування супозиторної маси з частотою обертання мішалки 0.9 с⁻¹ при температурі 60 °С протягом 1 год

забезпечує одержання супозиторіїв належної якості.

3. На базі експериментальних даних були вибрані температура дозування — (55-60) °С, частота обертання мішалки — 0.9 с⁻¹ та час перемішування — (30-60) хв, що забезпечують однорідність вмісту амінокапронової кислоти в супозиторній масі.

Результати дослідження реологічних властивостей супозиторіїв з амінокапроновою кислотою 0.5 г використані при розробці та стандартизації оптимальної технології супозиторіїв кровоспинної дії для дітей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Цагарейшвили Г.В., Башура Г.С. Консистентные свойства мягких лекарственных средств и методы их измерения. - Тбилиси, Мецниереба, 1969. — 97 с.

2. Северс Э.Т. Реология полимеров. — М., Химия, 1966 — 196 с.
3. Рудков А.П. Краткий курс коллоидной химии. — Л.: Государственное научно-техническое издательство химической литературы, 1958. — 280 с.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
5. European Pharmacopoeia, 4th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2002. — 2416 p.
6. Козлова Н.Г. Разработка технологии мазей противовоспалительного, ранозаживляющего и противоаллергического действия: Дис. ... канд. фармацевт. наук. - Харьков, 1983 — 167 с.
7. Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П., Столпер Ю.М. и др. Создание мягких лекарственных средств на различных основах. Сообщение 1. Исследование реологических свойств мазей на водорастворимых основах // Фармаком. — 1999. - № 6. — С. 10-16.
8. Драник Л.И., Козлова Н.Г., Долгая И.Н. Высвобождение аминокaproной кислоты из суппозитория // Фармация. — 1991. - № 1. — С. 61-62.
9. Ляпунов Н.А., Столпер Ю.М. Фармако-технологический тест «Устойчивость суппозитория и пессария к разрушению» при фармацевтической разработке, производстве и контроле качества готовых лекарственных средств // Фармаком. — 2002. - № 3. — С. 22-27.

Резюме

Долгая И.Н., Козлова Н.Г.,
Замараева Е.Е., Романова Я.Ю.

Изучение реологических свойств суппозитория с аминокaproной кислотой

Изучены реологические свойства суппозитория с аминокaproной кислотой 0.5 г и полиэтиленоксидной основы. Изучено влияние субстанции на реологические свойства суппозитория. Исследована зависимость структурной вязкости от градиента скорости сдвига, температуры и времени перемешивания. Показано, что структурная вязкость суппозитория с кислотой аминокaproной при увеличении скорости сдвига и температуры уменьшается. Перемешивание суппозиторной массы с частотой вращения мешалки 0.9 с^{-1} в течение 1 ч при температуре 60°C обеспечивает получение суп-

позитория надлежащего качества. Результаты исследований использованы при разработке технологии суппозитория с аминокaproной кислотой 0.5 г для детей.

Summary

Dolgaya I.N, Kozlova N. G.,
Zamarayeva E.E., Romanova Ya. Yu.

The study of rheological characteristics of suppositories with aminocaproic acid

The rheological characteristics of suppositories with an aminocaproic acid, 0.5 g, and polyethylene oxide base were studied. The influence of active substance on the rheological properties of suppositories was studied. The structural viscosity dependence on shear rate gradient, temperature and time of mixing was studied. It was shown that, when increasing the shear rate gradient and temperature, the structural viscosity had been decreased. The suppository mass mixing with the rotary speed of 0.9 s^{-1} and 60°C during one hour permits to obtain the suppositories of appropriate quality. The study results were used when developing the technology of the suppositories with the aminocaproic acid, 0.5 g, for children.

Довга Ірина Миколаївна. Закінчила Харківський державний університет (1982). Наук. співр. сектора супозиторних лікарських форм Державного підприємства "Державний науковий центр лікарських засобів" (ДП ДНЦЛЗ) (1999).

Козлова Неллі Георгіївна. Закінчила Харківський державний університет (1968). К.фарм.н. (1983). Зав. сектором супозиторних лікарських форм ДП ДНЦЛЗ (1999).

Замараєва Олена Євгеніївна. Закінчила Харківський державний університет (1983). Наук. співр. сектора супозиторних лікарських форм ДП ДНЦЛЗ.

Романова Яна Юріївна. Закінчила Українську фармацевтичну академію (УкрФА) (1996), магістратуру УкрФА (1998). Мол. наук. співр. сектора супозиторних лікарських форм ДП ДНЦЛЗ (2002).

УДК 615.454.1:615.262.1

Назарова О.С.

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів»

Розробка складу та технологій одержання комбінованих препаратів протизапальної та венотонічної дії на гелевій основі

Вивчення реологічних властивостей і структурно-механічних характеристик дозволило визначити тип течії та тиксотропні властивості гелевої основи та препаратів з її використанням, характеризувати поведінку гелевої основи і комбінованого препарату у процесі виробництва. Вивчення вивільнення діючих речовин дозволило визначити оптимальний склад препарату та технологію його одержання. На основі проведених досліджень і результатів фармакологічного вивчення науково обгрунтований склад комбінованих препаратів. Розроблено технології одержання комбінованих препаратів для використання в ревматології та флебології.

Проблема фармакологічної регуляції запалення залишається актуальною і до кінця не вирішеною у сучасній медицині. Це пов'язано з поширенням та різноманітністю запальних синдромів, складністю патогенетичних механізмів формування запалення, не завжди достатньою ефективністю та безпекою застосування засобів протизапальної дії [1, 2].

Наявна номенклатура лікарських форм, які використовуються для лікування запальних процесів при ревматичних захворюваннях та хронічній венозній недостатності, представлена, в основному, монопрепаратами закордонного виробництва та не повністю задовольняє потреби клініцистів як за асортиментом, так і за терапевтичною ефективністю [3, 4].

Запальні процеси звичайно супроводжуються біллю та набряком, тому перспективним є використання комбінації нестероїдних протизапальних засобів із лікарськими речовинами, які покращують мікроциркуляцію та знімають набряк у місці запалення [5].

Враховуючи переваги лікарських засобів для місцевого застосування [6], природу запальних процесів і специфіку терапії при місцевому застосуванні [7], створення ефективного вітчизняного препарату для лікування ревматичних та судинних захворювань із тромботичними ускладненнями у формі гелю є актуальним і необхідним для вирішення існуючих проблем практичної медицини.

У зв'язку з поступовим переходом фармацевтичних підприємств на виробництво лікарських засобів відповідно до вимог Надлежащої виробничої практики (GMP) велике значення при розробці та впровадженні у виробництво набуває, поряд із системою стандартизації якості готової продукції та технологічних параметрів виробництва, система стандартизації складу лікарського засобу (ЛЗ).

Із метою підвищення якості та ефективності терапевтичної дії при розробці складу м'якого ЛЗ особлива увага приділяється вибору допоміжних компонентів. Використання тих чи інших допоміжних речовин впливає на технологію одержання препарату, реологічні властивості, ступень вивільнення діючих речовин та стабільність при зберіганні [8, 9].

Метою наших досліджень є наукове обгрунтування складу комбінованих препаратів протизапальної та венотонічної дії на гелевій основі, експериментальне опрацювання та впровадження у виробництво технології одержання розроблених препаратів.

Матеріали та методи

Як протизапальний засіб нами був досліджений диклофенак натрію [10, 11]. Як речовина капіляррозміцнювальної та протинабрякової дії – L-лізину есцинат - водорозчинна сіль санопіну есцину із плодів гіркокаштана звичайного й амінокислоти L-лізину, синтезований у ДП «Державний науковий центр лікарських засобів» [12, 13].

Як основи, перспективні для розробки препарату, були досліджені запатентована нами карбопольна основа [14]; основа, що містить Na-карбоксиметилцелюлозу (Na КМЦ); аеросил-гліцериновий гель та карбопольна основа, що містить 30 % спирту етилового [15-17].

Для вибору оптимального складу комбінованих препаратів й одержання стабільної лікарської форми на гелевій основі нами були проведені такі фізико-хімічні та технологічні дослідження, як вивчення впливу температури та концентрації лікарських речовин на реологічні параметри гелевої основи, вивчення впливу основи та технології виготовлення препарату на вивільнення лікарських речовин.

Реологічні властивості зразків визначали на ротаційному віскозиметрі «Reotest RV-2»

(Німеччина) із коаксіальними циліндрами у широкому діапазоні швидкостей зсуву. Дослідження проводили при температурі $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ та $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$. За результатами вимірювання розраховували значення напруги зсуву та структурної в'язкості та будували реограми зразків у координатах: напруга зсуву — градієнт швидкості.

Дослідження вивільнення діючої речовини здійснювали методом рівноважного діалізу крізь напівпроникну мембрану фірми «Hoechst» (Німеччина) завтовшки 5.5 мкм у плазмозамінюючий розчин (буферний розчин рН 7.5). Дослідження проводили на приладі фірми «Sartorius» (Німеччина) (тип SM 16750) із мазевою камерою типу SM 16754 (діаметр камери 45 мм, висота 5 мм). Об'єм діалізату - 100 мл. Визначення проводили при температурі $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, яку підтримували за допомогою термостату, при перемішуванні магнітною мішалкою з постійною швидкістю обертання 100 об/хв.

Для кількісного визначення диклофенаку натрію та L-лізину есцинату в діалізаті використовували метод абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій області, відповідно.

Результати досліджень та їх обговорення

Відомо, що при додаванні діючої речовини реологічні властивості основи можуть суттєво змінюватися, характер і ступень цих змін залежить від природи та концентрації доданої речовини. Це слід брати до уваги при

визначенні кінцевого складу лікарської форми.

Реограми зразків гелю на запатентованій основі з концентрацією диклофенаку натрію від 1 % до 5 % при температурі 20°C та 34°C представлені на Рис. 1 і 2.

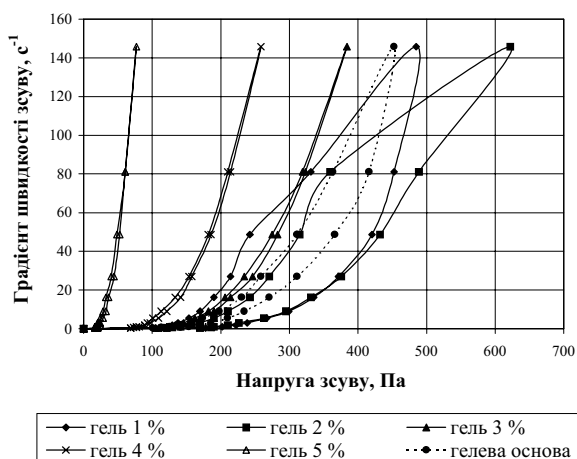
Одержані реограми показують, що із введенням диклофенаку натрію від 1 % до 4 % тип течії не змінюється у порівнянні з основою та характеризується як пластичний із нижньою межею плинності. Підвищення концентрації диклофенаку натрію до 3 % характеризується суттєвим зменшенням межі плинності та тиксотропних властивостей.

На основі експериментальних даних були розраховані значення структурної в'язкості досліджуваних зразків. Як видно з Рис. 3, при збільшенні концентрації диклофенаку натрію від 1 % до 5 % структурна в'язкість різко знижується і практично не залежить від температури (в межах досліджуваних температур).

Для вивчення впливу L-лізину есцинату на реологічні властивості запатентованої основи були приготовані зразки гелю з концентрацією L-лізину есцинату 1.0 %, 2.0 % і 3.0 %. Реограми зразків гелю L-лізину есцинату при температурі 34°C представлені на Рис. 4.

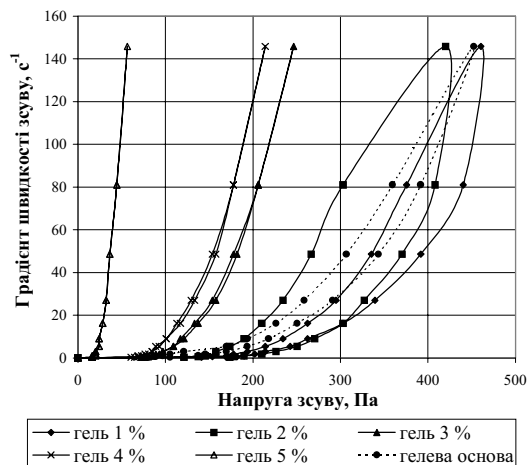
Як видно з Рис. 4, для зразків гелю з концентрацією L-лізину есцинату 1.0 % та 2.0 % при збільшенні швидкості деформації характерні тиксотропні властивості, які майже не виявляються для гелю з концентрацією L-лізину есцинату 3.0 %. Як і для диклофенаку натрію, підвищення концентрації L-лізину ес-

Рисунок 1



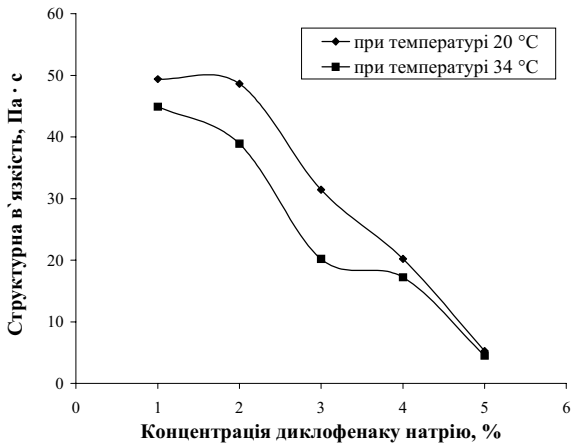
Залежність напруги зсуву від градієнта швидкості зсуву для різних концентрацій диклофенаку натрію в гелі (при температурі 20°C)

Рисунок 2



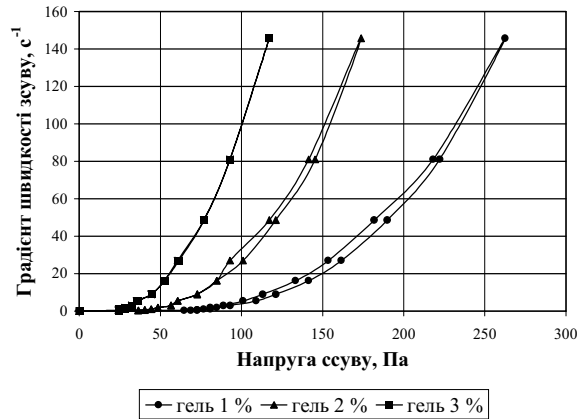
Залежність напруги зсуву від градієнта швидкості зсуву для різних концентрацій диклофенаку натрію в гелі (при температурі 34°C)

Рисунок 3



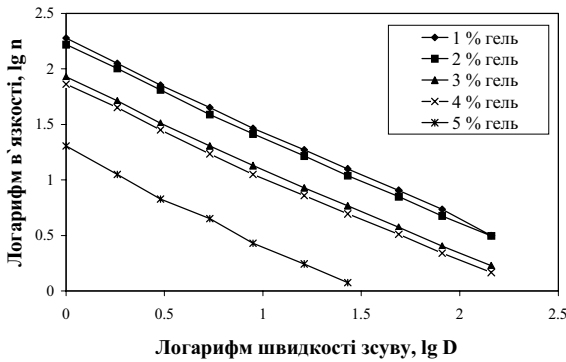
Залежність структурної в'язкості ($D = 5.4 \text{ c}^{-1}$) від концентрації диклофенаку натрію в гелі при температурі 20 °C та 34 °C

Рисунок 4



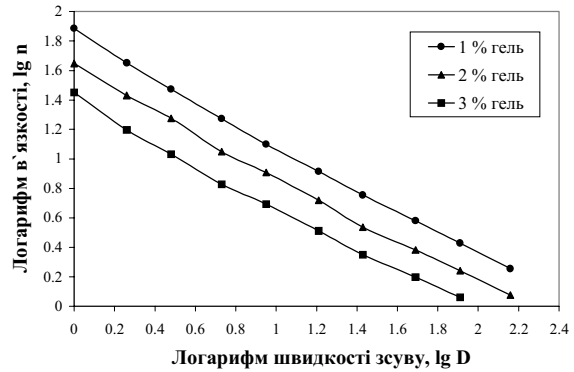
Залежність напруги зсуву від градієнта швидкості зсуву для різних концентрацій L-лізину есцинату (при температурі 34 °C)

Рисунок 5



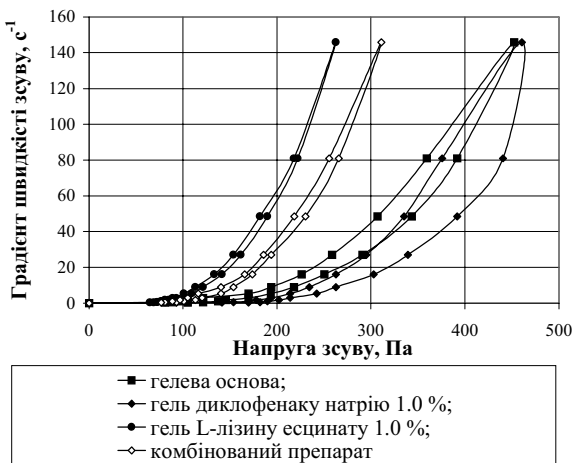
Залежність логарифму в'язкості від логарифму швидкості зсуву (при температурі 34 °C) для гелю з диклофенаком натрію

Рисунок 6



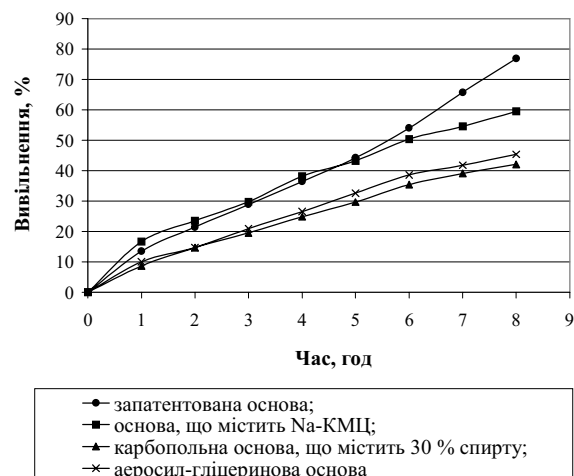
Залежність логарифму в'язкості від логарифму швидкості зсуву (при температурі 34 °C) для гелю із L-лізином есцинату

Рисунок 7



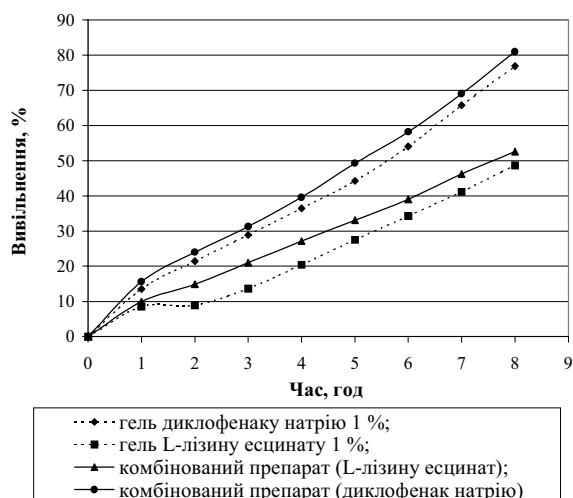
Залежність напруги зсуву від градієнта швидкості зсуву для досліджуваних зразків (при температурі 34 °C)

Рисунок 8



Кінетика вивільнення диклофенаку натрію з гелів, що виготовлені на різних основах

Рисунок 9



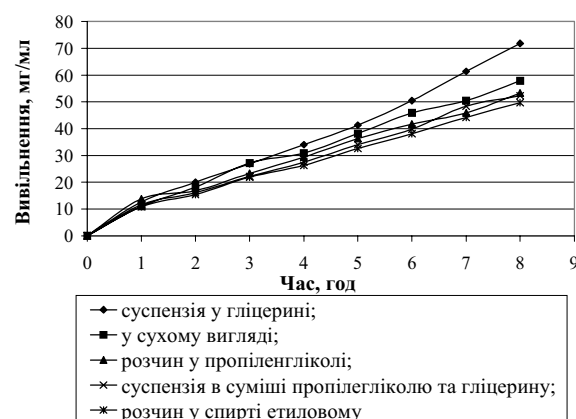
Кінетика вивільнення диклофенаку натрію та L-лізину есцинату з однокомпонентних та комбінованого препаратів

цинату призводить до зменшення межі плинності та втрати тиксотропності.

За обчисленими значеннями структурної в'язкості гелів побудували графіки залежності в'язкості від швидкості зсуву в логарифмічних координатах (Рис. 5 і 6). Одержана прямопропорційна залежність логарифму в'язкості від логарифму швидкості зсуву характеризує зразки гелів як структуровані дисперсні системи, які мають аномальну в'язкість [9].

Реограми комбінованого препарату, який містить диклофенак натрію та L-лізину есцинат у концентраціях 1 %, у порівнянні із реограмами запатентованої основи та однокомпонентних гелів із 1 % диклофенаку натрію та 1 % L-лізину есцинату, наведені на Рис. 7. Із Рис. 7 видно, що комбінований препарат, як і запатентована основа, за типом течії відносяться до пластичного типу з незначними тиксотропними властивостями, його реограма займає проміжне положення між реограмами однокомпонентних гелів. При цьому

Рисунок 10



Кінетика вивільнення диклофенаку натрію з гелевої основи при різних способах його введення в основу

на змінювання значення в'язкості комбінованого препарату із двох діючих речовин більше впливає введення до складу лікарського засобу L-лізину есцинату.

Для визначення структурно-механічних характеристик досліджуваних зразків були розраховані коефіцієнти температурного (K_t) та динамічного розрідження (K_D), які характеризують реологічні властивості препарату під час нанесення на шкірний покрив, та механічну стабільність (МС), яка характеризує ступень руйнування структури гелю у процесі необоротної деформації [18]. Одержанні дані представлені в Табл. 1.

Із аналізу даних, представлених в Табл. 1, видно, що K_t для запатентованої основи та для комбінованого гелю значно нижчий, ніж для основи, що містить Na-КМЦ, але це не впливає негативно на якість нанесення та розподіл гелю на шкірі. Вважаємо, що в даному випадку це є кількісним підтвердженням того, що препарат, розроблений на основі карбополу, є термостабільним (у межах до-

Таблиця 1

Структурно-механічні характеристики досліджуваних зразків

Об'єкт дослідження	K_t	K_D	МС
запатентована основа	8.70	36.51	1.203
гель диклофенаку натрію, 1 %	10.16	39.20	1.736
гель L-лізину есцинату, 1 %	8.32	36.88	1.024
комбінований препарат, 1 % диклофенаку натрію та 1 % L-лізину есцинату	9.21	35.16	1.079
основа, що містить Na-КМЦ	65.8	25.99	1.020

сліджуваних температур). Якісне розрідження та рівномірність розподілення по шкірі карбопольна основа забезпечує внаслідок того, що при нанесенні на шкіру вона контактує із солями секрету її потових залоз, у зв'язку з чим в'язкість препарату повільно падає, він розріджується та рівномірно розподіляється по шкірі [19, 20].

Значення K_D запатентованої основи та комбінованого гелю значно перевищує цей коефіцієнт для основи, яка містить Na-КМЦ, що забезпечує більш якісне нанесення препарату на шкіру при розтиранні. Із точки зору технології це забезпечить краще розрідження під час перемішування в реакторі, а значить і більш якісне розподілення введених в основу діючих речовин, а також полегшить заповнення туб.

Розраховані значення МС основи та комбінованого препарату близькі до 1, що свідчить про незначний ступінь руйнування структури гелю у процесі його перемішування. У зв'язку з цим можна передбачити, що під час виробництва препарату у промислових умовах не слід побоюватися механічної обробки в межах досліджуваних швидкостей перемішування. Близькість значень МС для комбінованого препарату та запатентованої основи свідчить про відсутність взаємодії між діючими речовинами та основою [21].

Вплив складу допоміжних речовин на вивільнення діючих речовин досліджували на прикладі зразків гелю з 1 % диклофенаку натрію, виготовлених на різних основах. Одержані дані представлені на Рис. 8 у вигляді кривих залежності вивільнення диклофенаку натрію (у відсотках) від часу діалізу.

Як видно з Рис. 8, вивільнення диклофенаку натрію з карбопольної основи, що містить 30 % спирту, та з аеросил-глицеринового гелю практично однакове і значно менше, ніж з основи, що містить Na-КМЦ, та із запатентованої основи. Слід зазначити, що вивільнення диклофенаку натрію з основи, що містить Na-КМЦ, та із запатентованої основи у перші 5 годин практично однакове, а надалі вивільнення із запатентованої основи збільшується і на 8 годину стає близько на 15 % вище. Крім того, основа, що містить Na-КМЦ, виявила себе нестабільною при зберіганні, а препарат на запатентованій основі - стабільним при зберіганні протягом двох років.

Дослідження вивільнення L-лізину есцинату із 1 % гелю та вивільнення натрію диклофенаку та L-лізину есцинату з комбінова-

ного препарату були проведені в таких самих умовах. Одержані дані представлені на Рис. 9.

Як видно з Рис. 9, вивільнення як диклофенаку натрію, так і L-лізину есцинату з комбінованого препарату вище, ніж з однокомпонентних препаратів близько на 5-10 %. Це свідчить про потенціювання вивільнення діючих речовин при їх спільному використанні.

Одержані дані узгоджуються з результатами фармакологічних досліджень лабораторії загальної фармакології ДП ДНЦЛЗ, проведених на тих самих зразках гелів із різним вмістом диклофенаку натрію та L-лізину есцинату. Дослідження показали, що найбільш раціональним є склад гелю, що містить 1 % диклофенаку натрію та 1 % L-лізину есцинату. Препарат за рахунок комбінації диклофенаку натрію з L-лізину есцинатом має більший спектр фармакотерапевтичних властивостей у порівнянні з монопрепаратами. Основними серед них є протизапальні, анальгетичні, протинабрякові та ангіопротекторні властивості, обумовлені пригніченням біосинтезу простагландинів, кінінів та інших медіаторів запалення та болю, стабілізуючим впливом на лізосомальні мембрани, зменшенням проникності капілярів. За рахунок L-лізину есцинату препарат покращує мікроциркуляцію, підвищує тонус венозних судин [22].

Аналітичні дослідження супроводжують фармацевтичну розробку препарату на всіх її етапах: у наукових дослідженнях з вибору складу, а також у дослідженнях, пов'язаних із розробкою аналітичної та технологічної документації. У процесі наукових досліджень з вибору складу були розроблені методики кількісного визначення діючих речовин у діалізаті для оцінювання процесу вивільнення. Із метою розробки аналітичної нормативної документації (АНД) обрані показники якості, розроблені та валідовані методики якісного та кількісного контролю препаратів [23]. Для контролю технологічного процесу розроблені методики кількісного визначення діючих речовин у проміжних продуктах виробництва.

Для розробки оптимального технологічного режиму були проведені дослідження впливу способу введення диклофенаку натрію в гелеву основу на вивільнення його з основи. Диклофенак натрію вводили до складу гелевої основи у вигляді суспензії у глицерині, розчину у пропіленгліколі, розчину у спирті етиловому, суспензії у суміші глицерину та пропіленгліколю, у сухому вигляді. Результати впливу способу введення диклофенаку нат-

рію на його вивільнення представлені на Рис. 10.

Як видно з Рис. 10, найвищий ступінь вивільнення диклофенаку натрію з гелю спостерігається при введенні його в гелеву основу у вигляді суспензії у гліцерині. На основі одержаних даних була розрахована константа швидкості вивільнення $K_{\text{вивільн.}}$, період напіввивільнення лікарської речовини $t_{1/2}$ та коефіцієнт дифузії K_D (Табл. 2). Розраховані величини кількісно підтвердили, що при створенні гелю більш раціональним є введення диклофенаку натрію в гелеву основу у вигляді суспензії у гліцерині. Одержані за цією технологією зразки відповідають вимогам за показниками якості «Однорідність» та «Розмір часток».

Технологічними дослідженнями визначені: послідовність уведення діючих та допоміжних речовин, умови проведення окремих стадій одержання препарату, критичні точки. На підставі проведених досліджень розроблені комбіновані препарати, які відрізняються способом введення L-лізину есцинату до складу гелевої основи та використовуваними консервантами. Проведені у заводських умовах випробування технології одержання препаратів дозволили розробити та стандартизувати умови виробництва у пусковому регламенті ВАТ «Київмедпрепарат» на препарат «Диклоцин» [24] та у технологічному регламенті АТ «Галичфарм» на препарат «Димецин». Препарати впроваджені у виробництво.

Висновки

1. На основі вивчення реологічних властивостей визначені тип течії та тиксотропні властивості гелевої основи та препаратів з її використанням. Встановлено, що тип течії не залежить від температури та концентрації діючих речовин (у досліджуваних межах).

2. На основі вивчення структурно-механічних характеристик показано, що запатентована гелева основа забезпечує кращі технологічні властивості препарату (розрідження

під час перемішування, розподілення діючих речовин) і що взаємодія між діючими речовинами та гелевою основою відсутня.

3. За результатами вивчення вивільнення *in vitro* встановлено перевагу запатентованої основи перед іншими досліджуваними основами, для розробки технології одержання препаратів обрано оптимальний спосіб введення диклофенаку натрію в гелеву основу (у вигляді суспензії у гліцерині).

ЛІТЕРАТУРА

1. Воспаление. Руководство для врачей / Под ред. Серова В.В., Паукова В.С. — М.: Медицина, 1995. - 640 с.
2. Лекарственная терапия воспалительного процесса: экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов / Сигидин Я.А., Шварц Г.Я., Арзамасцев А.П., Либман С.С. - М.: Медицина, 1988. - 240 с.
3. Компендиум 1999/2000 — лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. — К.: МОРИОН, 1999. - 1200 с.
4. Бакумов П.А. Какой препарат ближе к идеальному? Клиническая фармакология средств, применяемых при лечении хронической венозной недостаточности // В мире лекарств. - 2000. - №3 (9). - С. 18-21.
5. Кириенко А.И., Золот И.А. Острый варикотромбофлебит: диагностика, основные принципы лечения и профилактики // Русский мед. журн. - 1999. — Т. 7, №13. - С. 600-606.
6. Чичасова Н.В. Локальная терапия хронических заболеваний опорно-двигательного аппарата // Там же. - 2001. — Т. 9, № 7-8. - С. 286-289.
7. Маккаски Д.Е. Местные противоревматические средства // Терапевтический архив. — 1990. — Т. 62, № 5. - С. 113-115.
8. Цагарейшвили Г. В., Головкин В. А., Грошовый Т. А. Биофармацевтические, фармакокинетические и технологические аспекты создания мягких лекарственных форм. - Тбилиси: Мецниереба, 1987.-263 с.
9. Тенцова А.И., Грецкий В.М. Современные аспекты исследования и производства мазей. — М.: Медицина, 1980. - 192 с.
10. Сорока Н.Ф., Аликевич И.Н., Апанасович В.Г., Варонько И.А. Диклофенак натрия (Диклоген) - «золотой стандарт» в лечении заболеваний суставов // Русский мед. журн. - 2001. - Т. 9, № 7-8 — С. 289-291.
11. Балабанова Р.М. Диклофенак - оптимальный выбор нестероидного противовоспалительного препарата для семейного врача // Русский мед. журн. - 2002. — Т. 10, №15. - С. 654-658.
12. Способ получения DL-лизина — основания: А.с. № 1518948 СССР / Ю.В. Шостенко, А.Т. Шеин, Ю.И. Лапкина и др. (СССР). - № 3912896; Заявлено 15.04.85, Бюл. № 40. - С. 254

Таблиця 2

Кінетичні параметри вивільнення диклофенаку натрію в дослідах *in vitro*

Спосіб уведення диклофенаку натрію в основу	$K_{\text{вивільн.}}$ хв. ⁻¹	$t_{1/2}$, хв	K_D , 1/см ² ·хв
суспензія у гліцерині	0.00224	272.66	$3.80 \cdot 10^{-6}$
у сухому вигляді	0.00196	355.70	$2.64 \cdot 10^{-6}$
розчин у пропіленгліколі	0.00172	414.43	$1.94 \cdot 10^{-6}$
суспензія у суміші гліцерину та пропіленгліколю	0.00159	437.46	$1.89 \cdot 10^{-6}$
розчин у спирті етиловому	0.00163	431.74	$1.95 \cdot 10^{-6}$

13. Реканд С.А. Фармакологические эффекты нового венопротекторного вещества лизината эсцина // Труды III Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство». - М. - 1996. - С. 46.
14. Пат. 23754 Україна, МКИ А61К9/10, 31/115, 33/02. Основа для гелів / Губіна Т.М., Данельянц В.А., Ковальов І.П., Георгієвська О.І., Шеїна О.М., Назарова О.С., Шитєєва Т.О., Вєрбова Ю.М. (Україна). - Заявл. 18.03.97; Опубл. 31.08.98. - 6 с.
15. Панкрушева Т.А. Приготовление и исследование мазей пиромекаина и тримекаина для стоматологии: Автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук: 15.00.01 / Моск. мед. ин-т. - М., 1978. - 24 с.
16. Халєєва О.Л., Гунько В.Г., Перцев І.М. До питання створення комбінованого препарату з протигрибковою та кератолітичною дією // Фармац. журн. - 1993. - № 1. - С. 79-81.
17. Пат. 4670254 США, МКИ⁵ А 61К 031/78 Gel preparations for topical application of diclofenac sodium / Kamishita. - № 779519. - Заявл. 24.09.85; Опубл. 02.06.87. - 9 с.
18. Кутузова І.В., Бабанова Н.К., Тенцова А.І. Розробка технології отримання і біофармацевтичне дослідження мазей препарату полінасыщенних жирних кислот // Фармація. - 1990. - № 2. - С. 27—31.
19. Башура О.Г., Гладух Є.В., Баранова І.І., Кисельова Н.П. Перспективи використання карбополів у технології косметичних і лікарських гелів // Вісник фармації. - 1999. - 2 (20). - С. 73-76.
20. Panigrahi L., John T., Shariff A. Formulation and evaluation of lincomycin HCl gels // Indian J. Pharm. Sci. - 1997. - Vol. 59, No.6 - P. 330—332.
21. Гладішев В.В., Козленко В.В. Вивчення структурно - механічних характеристик нового антимікотичного препарату - мазі мебетизолової 5 % // Фармац. журн. - 1988. - № 4. - С. 50-52.
22. Чайка Л.О., Тимченко О.В., Андріанова Т.В., Лібіна В.В. Протизапальні властивості нового комбінованого препарату для наскірнього застосування - гелю «Диклоцин-КМП» // Труды II Національного з'їзду фармакологів України «Фармакологія 2001 - крок у майбутнє». - Дніпропетровськ, 2001. - С. 269.
23. Назарова О.С. Розробка методів аналізу деяких протизапальних лікарських препаратів на гелевій основі // Фармаком. - 2002. - № 4. - С. 69-74
24. Пат. 42079 Україна, МКИ А 61К9/10, А61К31/195, А61К31/196, А61Р29/00. Лікарський засіб «Диклоцин» для місцевого застосування у формі гелю / Георгієвський В.П., Ковальов І.П., Губіна Т.М., Данельянц В.А.,

Шитєєва Т.О., Назарова О.С., Вєрбова Ю.М., Чайка Л.О., Лібіна В.В., Андріанова Т.В., Тимченко О.В., Виноградов В.В., Кузуб Г.М., Парфєнова С.В., Гришуткіна В.М. (Україна). - № 98010294. - Заявлено 20.01.98; Опубл. 15.10.2001, Бюл. № 9. - 4 с.

Резюме

Назарова Е.С.

Разработка состава и технологий получения комбинированных препаратов противовоспалительного и венотонизирующего действия на гелевой основе

Изучение реологических свойств и структурно-механических характеристик позволило определить тип течения и тиксотропные свойства гелевой основы и препаратов с её использованием, характеризовать поведение гелевой основы и комбинированного препарата в процессе производства. Изучение высвобождения действующих веществ позволило определить оптимальный состав препарата и технологию его получения. На основании проведенных исследований и результатов фармакологического изучения научно обоснован состав комбинированных препаратов. Разработана технология получения комбинированных препаратов для применения в ревматологии и флебологии.

Summary

Nazarova E.S.

Development of composition and technologys of the combined drugs with anti-inflammatory and vein tonic effect

Study of rheological properties and structurally-mechanical characteristics allowed to define the fluidity character and thixotropic properties of gel base and drugs with its use, to characterize the in-process behavior of gel base and combined drug. The study of active substances release allowed to define the optimum composition of drug and technology of its production. On the basis of studies being performed and the results of pharmacological investigation the composition of combined drugs was substantiated. The production technology of drugs to be used in rheumatology and phlebology was developed.

Назарова Олена Сергіївна. Закінчила Харківський політехнічний інститут (1993). Працює в ДП ДНЦЛЗ (з 1994). Наук. співр. сектору трансдермальних терапевтичних систем та гелів лабораторії фізико-хімічних процесів ДП ДНЦЛЗ (2003).

Фітохімічні дослідження

УДК 547.587.51:577.152.311:542.978:542.947:582.736:582.893.6

Янченко П.С., Ковальова А.М., Георгієвський Г.В., Комісаренко А.М.
Національний фармацевтичний університет
Державне підприємство "Державний науковий центр лікарських засобів"

Виділення та вивчення деяких кумаринів і хромонів із рослин родин бобові та селерові та їх ліпазотропна активність

Із рослин родин бобові (*Vicia tenuifolia* Roth., *Coronilla varia* L., *Melilotus alba* L. та *Melilotus officinalis* L.) та селерові (*Angelica archangelica* L., *Heracleum sphondylium* L., *Daucus carota* L.), а також субстанції піфламін виділено 12 речовин — похідних бензо- α -пірону. Із них вперше із надземної частини *Daucus carota* L. виділено умбеліпренін та умбеліферон, із листя *Heracleum sphondylium* L. - остол. Вперше встановлено здатність впливати на активність ліпази 10 речовин кумаринової (кумарин, умбеліферон, ескулетин, ескулін, остол, дикумарин, піранокумарини: віснадін та дигідро-піранокумарин) та хромонової (келін та 5-гідроксикелін) природи. Найбільш перспективними для подальших досліджень визначено 5-гідроксикелін (активатор ліпази) та кумарин (інгібітор ліпази).

Метаболізм ліпідів представляє собою тонкий баланс між синтезом та деградацією жирів, зокрема тригліцеридів. Порушення цього балансу призводить до багатьох патологічних станів, наприклад, гіпертригліцеридемії, гіперхолестеринемії, формування атеросклеротичних бляшок, або, навпаки, дефіцитним станам - гіповітамінозу жиророзчинних вітамінів та ін. У свою чергу подібні стани призводять до розвитку небезпечних захворювань, таких як атеросклероз, гіпертензія, ожиріння, дистрофія та ін. [1].

Одним із ключових ферментів ліпідного обміну організму є панкреатична ліпаза, яка є ензимом, що розщеплює у кишечнику тракті емульсифіковані аліментарні тригліцериди, переводячи їх у форму, що може бути засвоєна організмом [1]. Дуже цікавою нам представляється можливість впливати на активність панкреатичної ліпази за допомогою певних фармакологічних агентів із метою пригнічення її активності (що має значення при ожирінні, атеросклерозі, гіперліпідемії, гострому панкреатиті та ін.), або, навпаки, збільшення її активності (ензимодефіцитні стани, харчове навантаження, диспепсичні стани).

На даний момент дослідження ліпазотропної активності (здатності впливати на активність ліпази) фізіологічно активних речовин рослинного походження є перспективними. Одним із значних успіхів у пошуку речовин, що мають ліпазотропну дію, стало створення препарату для лікування ожиріння «Ксенікал» («Xenical», INN - orlistat) компанією «Hoffman-La Roche», який є полусинтетичним похідним ліпстатину — інгібітору

ліпази мікробіологічного походження, одержаного із *Streptomyces toxytricini* [2, 3].

Роботи з пошуку рослин та рослинних біологічно активних речовин (БАР), які б мали гіполіпемічну активність, проводяться японськими, китайськими та індійськими вченими. Також ведуться роботи з пошуку рослинних інгібіторів ліпази. Інгібіторами ліпази визначені фенольні сполуки *Alpinia officinalis* L., зокрема 3-метоксигалангін (3-оксиметил-5,7-дигідроксифлавонол) [4], сапоніни чайного листа [5], гесперидин, що був одержаний із *Citrus unshiu* L. [6]. Перспективним також є дослідження сумарних екстрактів. Є дані про інгібуючі властивості екстрактів *Eriobotrya japonica* Lindl. та *Equisetum giganteum* L. [7, 8], а також сумарних рослинних препаратів китайської традиційної медицини Daio-Orengedokuto та Orengedokuto, що містять radix *Scutellaria*, rhizoma *Coptidis*, cortex *Phellodendri*, fructus *Gardenie*, rhizome *Rhei* (останній містить тільки Daio-Orengedokuto) [9].

У результаті цілеспрямованого експрес-скринінгу ліпазотропних речовин, проведеного на кафедрі фармакогнозії Національного фармацевтичного університету, була визначена перспективність пошуку ліпазотропних речовин у таких групах природних БАР як антрахінони, серед яких були визначені активатори ліпази [10]; фенольні сполуки — кумарини, флавоноїди [11]; терпеноїди [12]; карденоліди [13].

Таким чином, рослинні БАР є перспективним джерелом ліпазотропних речовин, які мають всі вагомні переваги рослинних препаратів (відносно низька токсичність, широкий терапевтичний індекс, незначний ризик роз-

Таблиця

Фізико-хімічні властивості виділених речовин

Речовина	Джерело виділення	Брутто-формула	Т.пл.	Оптичне обертання	Методи ідентифікації
<i>Похідні кумарину</i>					
кумарин (бензо- α -пірон)	суцвіття та листя <i>M. alba</i> та трава <i>M. officinalis</i>	$C_9H_6O_2$	(67 – 68) °C	-	- відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком кумарину; - ІЧ-спектр (1723 cm^{-1} (СО-група α -пірону), 1610 cm^{-1} , 1562 cm^{-1} (ароматичне кільце)); - УФ-спектр (λ_{max} 320 нм і 255 нм (lg ϵ 4.15 і 3.74)
2,3-дигідроксикумарин	надземна частина <i>M. alba</i>	$C_9H_8O_2$	25 °C	-	- відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком 2,3-дигідроксикумарину
дикумарин	надземна частина <i>M. alba</i>	$C_{19}H_{12}O_6$	(287 – 289) °C (із ацетону)	-	- відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком дикумарину
умбеліпренін	листя <i>A. archangelica</i> , <i>H. sphondylium</i> , <i>D. carota</i> (вперше)	$C_{24}H_{30}O_3$	(60 – 61) °C	-	- характер флуоресценції в УФ-світлі; - дані елементного складу; - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком умбеліпреніну; - результати кислотного гідролізу (ідентифіковано умбеліферон)
остол (7-метокси-8-ізопентенілкумарин)	листя <i>A. archangelica</i> , <i>H. sphondylium</i> (вперше), <i>D. carota</i> (вперше)	$C_{15}H_{16}O_3$	(82 – 85) °C	-	- хроматографування у системі розчинників петролейний ефір - формамід ($R_f=0.89$) паралельно з достовірним зразком остолу ($R_f=0.89$); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком остолу
умбеліферон (7-гідроксикумарин)	листя <i>A. archangelica</i> , <i>H. sphondylium</i> , <i>D. carota</i> (вперше), <i>V. tenuifolia</i> , <i>C. varia</i>	$C_9H_6O_8$	(233 – 235) °C	-	- характер флуоресценції в УФ-світлі (блакитна пляма, після обробки спиртовим розчином луку флуоресценція посилюється); - ІЧ-спектр (1616 cm^{-1} , 1577 cm^{-1} – С–Н; 3260 cm^{-1} , 3350 cm^{-1} – –ОН; 1720 cm^{-1} , 1730 cm^{-1} – =C=O); - УФ-спектр (96 % спирт – 230 нм, 257 нм, 326 нм, після додавання натрію етилату - батохромний зсув – 240 нм, 361 нм); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком умбеліферону; - результати метилювання (ідентифіковано герніарин); - дані елементного складу



Таблиця (продовження)

Речовина	Джерело виділення	Брутто-формула	Т.пл.	Оптичне обертання	Методи ідентифікації
дафноретин (6-метокси-7-гідрокси-3,7-дикумариловий ефір)	надземна частина <i>C. varia</i>	$C_{19}H_{12}O_7$	(254 – 256) °C	-	- дані елементного складу; - результати термічного розщеплення (ідентифіковано умбеліферон та скополетин)
скополетин (6-метокси-7-гідроксикумарин)	надземна частина <i>A. archangelica</i> , <i>H. sphondylium</i> , <i>D. carota</i> , <i>V. tenuifolia</i> , <i>C. varia</i> , субстанція піфламін	$C_{10}H_8O_4$	(200 – 202) °C	-	- ІЧ-спектр (1610 cm^{-1} – C–H; 2986 cm^{-1} , 2844 cm^{-1} –OCH ₃); - УФ-спектр (96 % спирт – 230 нм, 255 нм, 291 нм, 345 нм, після додавання натрію етилату - батохромний зсув – 239нм, 395 нм); - дані метилування (ідентифіковано скопарон)
ізоскополетин (6-гідрокси-7-метоксикумарин)	надземна частина <i>C. varia</i>	$C_{10}H_8O_4$	(185 – 187) °C	-	- дані метилування (ідентифіковано скопарон); направлений синтез із ескуліну; - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком ізоскополетину
ескулетин (6,7-дигідроксикумарин)	надземна частина <i>V. tenuifolia</i> , субстанція піфламін	$C_9H_6O_4$	(269 – 270) °C	-	- дані метилування (ідентифіковано скопарон); - дані елементного складу; - висока полярність при хроматографуванні у системі хлороформ – формамід
ескулін (6-О-β-D-глюкопіранозил-7-гідроксикумарин)	надземна частина <i>V. tenuifolia</i> , субстанція піфламін	$C_{15}H_{16}O_9$	(147 – 150) °C	$[\alpha]_D^{21} = -143,0^\circ$ (метанол)	- дані ферментативного гідролізу (ідентифіковано ескулетин та D-глюкозу); - дані метилування з подальшим гідролізом (у гідролізаті визначено 6-гідрокси-7-метоксикумарин)
Похідні піранокумарину					
віснадін (3'-ангелілоокси-4'-ацетокси-3',4'-дигідросеселін)	субстанція авісан	$C_{21}H_{24}O_7$	(85 – 87) °C	$[\alpha]_D^{21} = +39,5^\circ$ (діоксан)	- дані елементного складу; - оптичне обертання речовини; - хроматографування в системі розчинників петролейний ефір - формамід ($R_f=0.83$) паралельно з достовірним зразком віснадіну ($R_f=0.83$).



витку побічних ефектів) та можуть мати як інгібуючі, так і активуючі властивості.

Метою даної роботи є виділення, ідентифікація та визначення ліпазотропної активності деяких похідних бензо-α-пірону (похідні кумарину) та бензо-γ-пірону (похідні хромону), які були виділені нами з деяких рослин родин бобові та селерові та сумарних рослинних препаратів. (Раніше повідомлялось про ліпазотропну активність екстрактів із зазначених вище рослин [14]).

Матеріали та методи

Сировиною для виділення індивідуальних речовин були надземні частини рослин *Angelica archangelica* L., *Heracleum sphondylium* L., *Daucus carota* L. (Apiaceae) та *Vicia tenuifolia* Roth., *Coronilla varia* L., *Melilotus alba* L., *Melilotus officinalis* L. (Fabaceae), зібрані у липні 2003 року в Харківському та Дергачівському районах Харківської області, та субстанція піфламін. Сировиною для виділення похідних піранокумарину та фурохромону була субстанція авісан.

Таблиця (продовження)

Речовина	Джерело виділення	Брутто-формула	Т.пл.	Оптичне обертання	Методи ідентифікації
<i>Похідні хромону</i>					
келін (2-метил-5,9-диметоксифуро-2',3':6,7-хромон)	субстанція авісан	C ₁₄ H ₁₂ O ₅	(152 – 153) °C	-	- речовина відповідала вимогам ФС 42-956-75 на келін-стандарт за показниками «Опис», «Розчинність», «Ідентифікація», «Температура плавлення»; - хроматографування в системі розчинників циклогексан – етилацетат - метанол (12:4:1) (R _f =0.56) паралельно з достовірним зразком келіну (R _f =0.56); - відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком келіну
5-гідроксикелін (2-метил-5-окси-9-метоксифуро-2'3':6,7-хромон)	напівсинтез із келіну	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	(197 – 200) °C	-	- відсутність депресії температури плавлення у пробі змішування з достовірним зразком келіну; - хроматографування в системі розчинників хлороформ – метанол (R _f =0.83) паралельно з достовірним зразком 5-гідроксикеліну (R _f =0.83); - дані елементного складу.

Виділення суми кумаринів із відповідних вегетативних органів зазначених рослин проводили за допомогою екстракції спирто-водними сумішами із подальшою обробкою одержаного залишку неполярними розчинниками (бензолом, хлороформом, етилацетатом, петролейним ефіром). Одержані суми кумаринів розділяли за допомогою хроматографії на колонках, заповнених кислим оксидом алюмінію, або силікагелем із 5 % гіпсу. Контроль за хроматографуванням проводили в УФ-світлі, за допомогою хроматографії на папері або тонкошарової хроматографії.

Келін з авісану виділяли екстракцією ди-хлоретаном. Віснадін був виділений з авісану за допомогою хроматографії на колонках, заповнених кислим оксидом алюмінію.

Синтез 5-гідроксикеліну було здійснено із келіну шляхом нагрівання його з калію йодидом у присутності кислоти оцтової концентрованої при температурі 100 °C протягом 6 год.

Ідентифікацію виділених речовин проводили після підтвердження їх кумаринової структури реакцією з кислотою йодистоводневою у середовищі рідкого фенолу з оцтовим ангідридом [15]. Для подальшої ідентифікації речовин проводили порівняння їх фізико-хімічних властивостей з властивостями

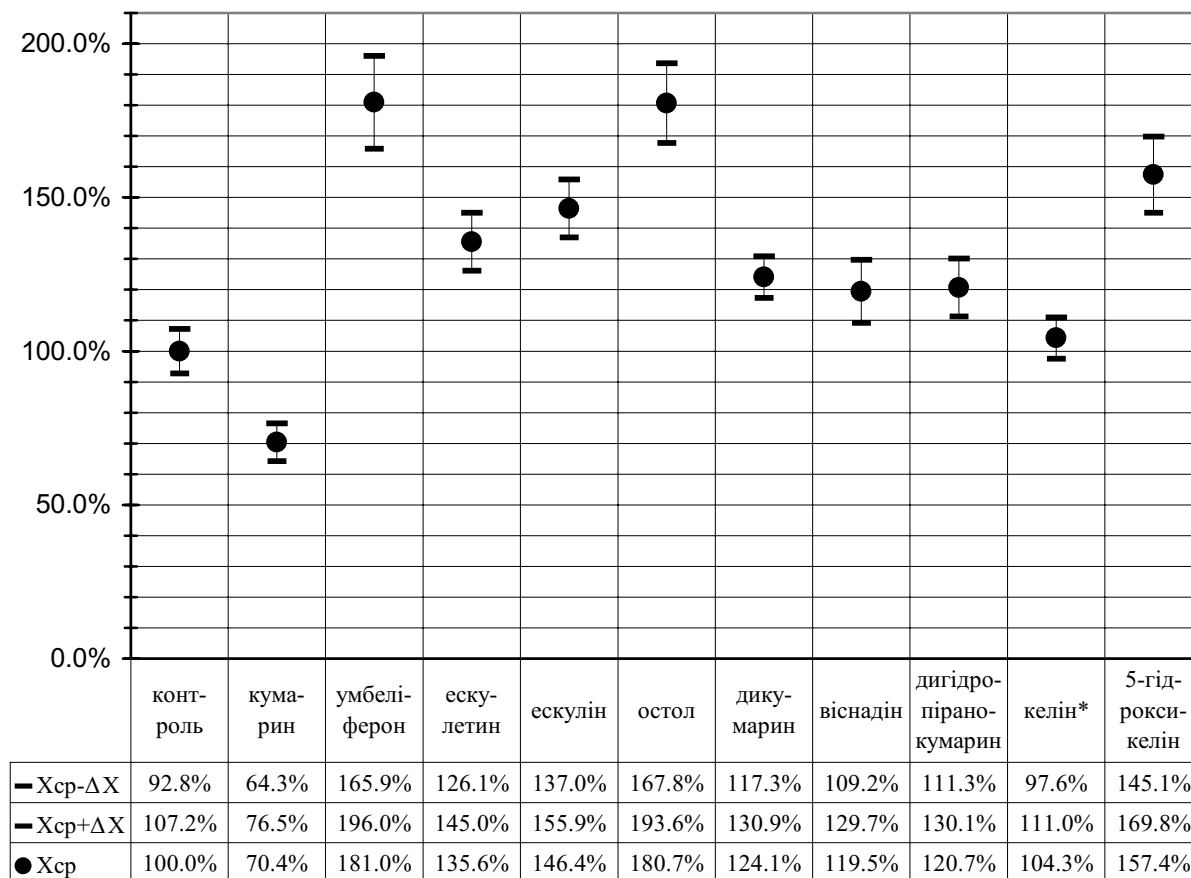
ми достовірних зразків. Температуру плавлення визначали за допомогою прибору «Buchі Melting Point B-545» (Швейцарія), ІЧ-спектри зняті на приборі «Nicolet Avatar 320 IR» (США), УФ-спектри одержані на спектрофотометрі «Hewlett Packard HP 8452». Елементний аналіз проведено на автоматичному аналізаторі «C-H-N Hewlett Packard M-185» (США).

Визначення ліпазотропної активності проводили за допомогою методу рН-статування у модифікації для рослинних БАР [16, 17]. Суть даного методу полягає у підтримці певного значення рН протягом ліполітичної реакції за допомогою титранту – розчину луку. Активність ліпази пропорційна швидкості витрати титранту. Ліпазотропну активність речовини встановлювали визначенням достовірної різниці між швидкістю витрати титранту в досліді з випробовуваною речовиною та контрольному досліді. Використовували методи статистичної обробки та інтерпретації результатів, описані в [18].

Для проведення екстракції, хроматографування, кристалізації та ін. використовували розчинники та реактиви марки х.ч. та ч.д.а.

Як модельний фермент використовували панкреатин (Pancreatin from hog pancreas, «Fluka P.N.», кат. № 76190). Як субстрат ви-

Рисунок 1



* — значуще не відрізняються від контролю ($n_k = 76, n_A = 3, P = 99.95$)

Відносна активність ліпази в дослідях із виділеними речовинами

користували оливкову олію фармакопейної якості.

Зразок дигідропіранокумарину, використаний для визначення ліпазотропної активності, був предоставлений професором, д.фарм.н. Комісаренко Н. Ф.

Обговорення результатів досліджень із виділення індивідуальних речовин

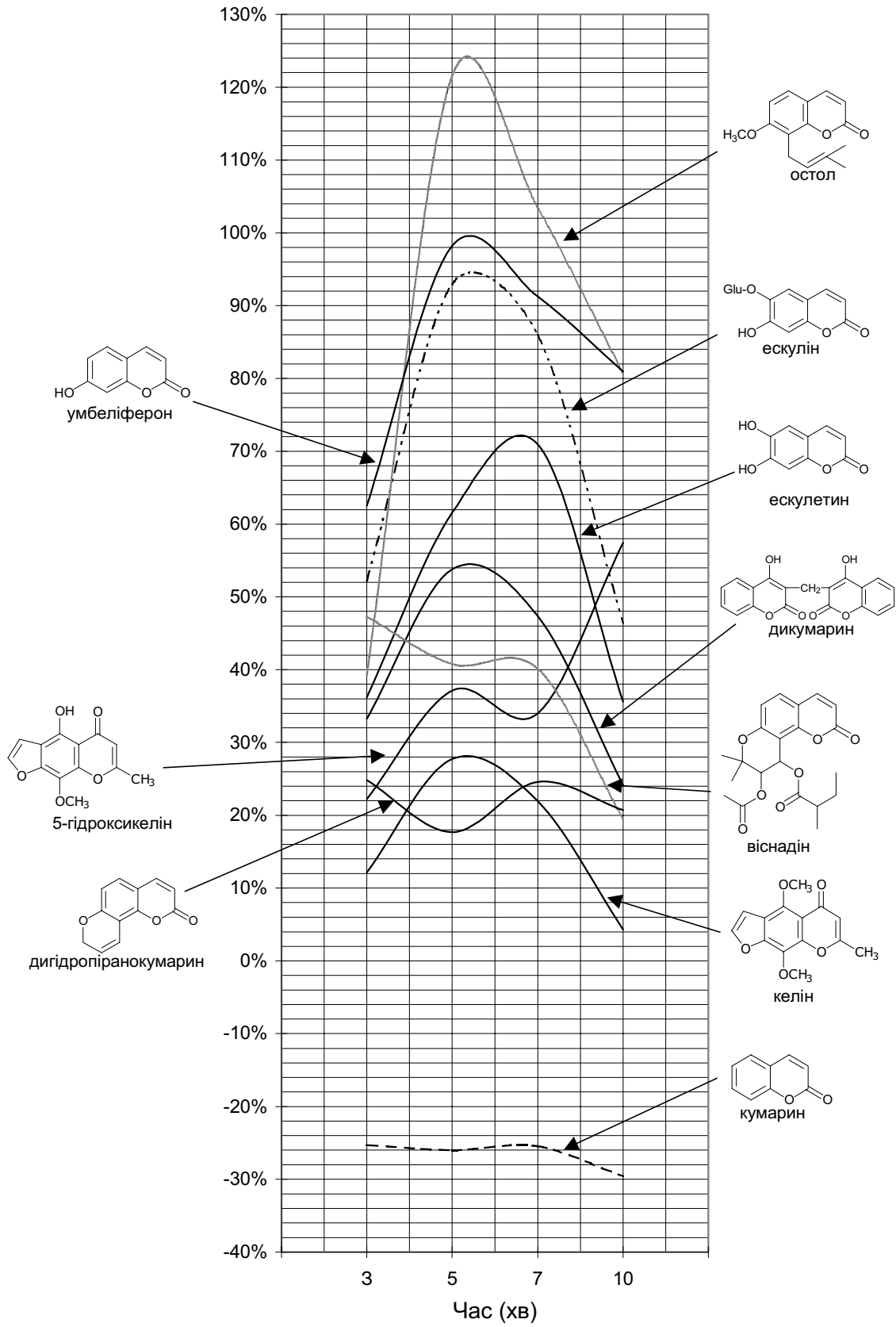
Використання методів багаторазової екстракції та хроматографічного розподілу речовин на колонках, заповнених кислим оксидом алюмінію або силікагелем із 5 % гіпсу, із подальшою перекристалізацією речовин дозволило виділити із зазначеної сировини прості кумарини, піранокумарини та фурухромони (Таблиця). При цьому одержано 9 речовин у кількості, достатній для визначення їх ліпазотропної активності.

Обговорення результатів досліджень із визначення ліпазотропної активності виділених речовин

Нами була визначена ліпазотропна активність 10 речовин: 6 простих кумаринів, 2 піранокумаринів та 2 фурухромонів. Більшість речовин в умовах експерименту виявляла ліпазотропну активність. Дані про середню відносну активність панкреатичної ліпази в досліді з випробовуваною речовиною та контрольному досліді на 10 хвилину реакції ліполізу наведені на Рис. 1.

Із Рис.1 видно, що тільки кумарин мав здатність пригнічувати активність ліпази в умовах експерименту, інші речовини прискорювали ліполіз, при цьому найбільш виражений активуючий вплив серед простих кумаринів мали умбеліферон та остол, серед хромонів - 5-гідроксикелін, для келіну різниця швидкості ліполізу була недостовірною ($n_k = 76, n_A = 3, P = 99.95$). Обидва піранокумарини мали незначні активуючі властивості на

Рисунок 2



Динаміка ліпазотропної активності досліджуваних речовин

однаковому рівні (різниця впливу речовини на ліполіз не достовірні ($n_{A1} = 3$, $n_{A2} = 3$, $P = 99.95$)).

Для одержання більш конкретних даних про вплив випробовуваних речовин на реакцію ліполізу відносно часу ліполітичної реакції вимірювали середню швидкість ліполізу через 3 хв, 5 хв, 7 хв та 10 хв від початку реакції. Динаміка ліпазотропного ефекту наведена на Рис 2.

Як видно з Рис. 2, для більшості речовин характерний розвиток впливу на ліпазу протягом перших 5-7 хв реакції з подальшим згасанням ефекту, що, можливо, є слідством конкурування з вільними жирними кислотами, що накопичуються в реакційному середовищі. Дана закономірність, однак, не спостерігається для 5-гідроксикеліну та кумарину, ліпазотропний ефект яких зростає протягом всього експерименту. Слід відмітити перспективність подальшого дослідження механізму впливу даних речовин на ліпазу.

Висновки

1. Из рослин родин бобові (*Vicia tenuifolia* Roth., *Coronilla varia* L., *Melilotus alba* L. та *Melilotus officinalis* L.) і селерові (*Angelica archangelica* L., *Heracleum sphondylium* L., *Daucus carota* L.) та субстанції піфламін виділено та встановлено структуру 12 речовин, що є похідними кумарину, із субстанції авісан - хронону (келін). Из надземної частини *Daucus carota* L. було вперше виділено умбеліпренін та умбеліферон, із листя *Heracleum sphondylium* L. — остол.

2. Вперше встановлено ліпазотропну активність 10 речовин кумаринової (кумарин, умбеліферон, ескулетин, ескулін, остол, дикумарин і піранокумарини: віснадін, дигідропіранокумарин) та хромонової (келін, 5-гідроксикелін) природи. Найбільш перспективними для подальших досліджень 5-гідроксикелін (активатор ліпази) та кумарин (інгібітор ліпази).

ЛІТЕРАТУРА

1. Winkler F.K., D'Arcy A., Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase // Nature. — 1990. — No. 343 (6260). — P. 771-774.
2. Пат. 4598089 США, МКИ⁴ С 07 D 305/12, С 12 P 17/02. Leucine derivatives / Hadvary P., Hoelust E., Kupfer E., Lengsfeld G. et al.; Hoffman La Roche. - № 621827; Заявл. 18.06.1985; Опубл. 1.07.1986. — 8 с.
3. Пат. 5540917 США, МКИ⁶ А 61 К 31/74. Biomass lipase inhibitor useful for treating adiposity / Isler D., Rehm W., Widmer E. (Швейцарія); Hoffman-La Roche Inc. - № 447164; Заявл. 19.05.1995; Опубл. 30.07.1996. — 5 с.
4. Ji-Eun Shin, Myung Joo Han, Dong-Hyun Kim. 3-Methylethergalangin isolated from *Alpinia officinarum*

Inhibits Pancreatic Lipase // Biol Pharm Bull. — 2003. — Vol. 26, No. 6. — P. 854—857.

5. Han L.K., Kimura Y., Kawashima M. et al. Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor // Int J. Obes. Relat. Metab. Disord. — 2001. — Vol. 25, No. 10. — P. 1459 — 1464.

6. Kawaguchi K., Mizuno T., Aida K., Uchino K. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas* // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1997. — Vol. 61, No. 1 — P. 102—104.

7. Пат. 11228338 Японія, МКИ⁶ А 61 К 7/00. Lipase inhibitor and pimple improving preparation for external use / Kawai E., Inaba T., Ota M. (Японія). - Shiseido Co Ltd. - № 10042917; Заявл. 09.08.1998; Опубл. 24.08.1999. — 4 с.

8. Пат. 10265364 А Японія, МКИ⁶ А 61 К 7/48. Lipase inhibitor and external preparation for skin for pimple / Kawai E., Inaba T., Kitamura K. (Японія). - Shiseido Co Ltd. - № 09085885; Заявл. 19.03.1997; Опубл. 06.10.1998. — 5 с.

9. Young-Suk Kim, Eun-Ah Jung, Ji-Eun Shin et al. Daio-Orengedokuto Inhibits HMG-CoA Reductase and Pancreatic Lipase // Biol. Pharm. Bull. — 2002. — Vol. 25, No. 11. — P. 1442—1445.

10. Журавльов М.С., Ковальова А.М., Комісаренко А.Н., Крючкова Т.М., Абу Дарвіш Мухамед / Вивчення ліпотропної активності природних антрахінонів та їх синтетичних аналогів // Вісник фармації. — 1999. — № 1. — С. 29—32.

11. Ковальова А.М. Визначення ліпотропної активності поліфенольних сполук рослинного походження // Там же. — С. 25—28.

12. Ковалёва А.М. Определение липотропной активности некоторых эфирных масел и их компонентов // Провизор. — 1999. - № 5. - С. 47—48.

13. Комиссаренко А. Н., Ковалёва А. М., Ковалёв С.В., Чаусов В. И. Липотропная активность карденолидов // Там же. - № 6. - С 46—47.

14. Янченко П.С., Ковальова А.М., Комісаренко А.М. Ліпазотропна активність екстрактів з рослин деяких видів родин бобові та селерові // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: Зб. наук. ст. — Т. 3 — Запоріжжя: Вид-во ЗДМУ, 2004. — С. 308-314.

15. Дрозд Г.А., Комиссаренко Н.Ф. Качественное обнаружение кумаринов в растительном сырье // IV Всесоюзный симпозиум по фенольным соединениям: Тез. докл. — Ташкент, 1982. — С. 27—28.

16. Янченко П.С., Комісаренко А.Н., Георгієвський Г.В. Метод визначення ліпазотропної активності речовин // Фармаком. — 2001. - № 3. — С. 44—47.

17. Исследование липазотропной активности силибора / Янченко П.С., Пашнев П.П., Казаринов Н.А., Комиссаренко А.Н. // Фармаком. — 2003. — № 1. — С. 75—77.

18. Проект загальної статті Державної Фармакопеї України «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту^N» // Фармаком. - № 1. — 2003. — С. 19-49

Резюме

Янченко П.С., Ковалёва А.М., Георгієвський Г.В., Комиссаренко А.Н.

Выделение и изучение некоторых кумаринов и хромонов из растений семейств бобовые и сельдерейные и их липазотропная активность

Из растений семейств бобовые (*Vicia tenuifolia* Roth., *Coronilla varia* L., *Melilotus alba* L. та *Melilotus officinalis* L) и сельдерейные (*Angelica archangelica* L.,

Heracleum sphondylium L., *Daucus carota* L.), а также субстанции пифламин выделено 12 веществ – производных бензо- α -пирона. Из них впервые из надземной части *Daucus carota* L. выделены умбеллиферон и умбеллипренин, из листьев *Heracleum sphondylium* L. – остол. Впервые установлена способность влиять на активность липазы 10 веществ кумариновой природы (кумарин, умбеллиферон, эскулетин, эскулин, остол, дикумарин; пиранокумарины – виснадин и дигидропиранокумарин) и хромоновой (келлин, 5-гидроксикеллин) природы. Наиболее перспективными для дальнейших исследований выбраны 5-гидроксикеллин (активатор липазы) и кумарин (ингибитор липазы).

Summary

Yanchenko P.S., Kovalyova A.M., Georgiyevskiy G.V., Komissarenko A.N.

Isolation and study of some coumarines and chromones from legume and celeriac plants and their lipasetropic activity

Twelve substances being the benzo-a-pirone derivatives were isolated from legume plants (*Vicia tenuifolia* Roth., *Coronilla varia* L., *Melilotus alba* L. and *Melilotus officinalis* L) and celeriac plants (*Angelica archangelica* L., *Heracleum sphondylium* L., *Daucus carota* L.) as well as from Piflamin substance. For the first time umbelliferone and umbelliprenine were isolated from *Daucus carota* L. overground part, and ostol - from *Heracleum sphondylium* L. leaves. The capability of 10 substances of coumarinic (coumarine, umbelliferone, esculetine, esculine, ostol, dicouma-

rine, pyranocoumarines:- visnadine and dihydropyranocoumarine) and chromonic nature (kelline and 5-hydroxykelline) to impact on lipase activity was established for the first time. 5-Hydroxykelline (lipase activator) and coumarin (lipase inhibitor) were considered to be the most perspective for the further study.

Янченко Павло Сергійович (н. 1978). Закінчив Національну фармацевтичну академію (2000). Аспірант кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету.

Ковальова Алла Михайлівна. Закінчила Харківський фармацевтичний інститут. Д.фарм.н. Доцент кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету.

Георгієвський Геннадій Вікторович (н. 1969). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1992). К.фарм.н. (1995). Ст. науковий співробітник відділу Державної Фармакопеї України ГП НЕФЦ, Зав. лабораторії фізико-хімічних процесів ГП ДНЦЛЗ (2001).

Комісаренко Андрій Миколайович (н. 1962). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1984). Д.фарм.н. (2000). Доцент кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету.

УДК 577.127.4:633.933:54.061:54.062

Сулейманов Т.А.

Азербайджанский медицинский университет

Флавоноиды *Astragalus Johanna* L.

В статье изложены результаты фитохимических исследований по выделению, установлению строения, количественному определению флавоноидов в траве астрагала Йоганна. Флавоноиды представлены кемпферолом, кверцетином, изорамнетинном и гликозидами: кемпферол-7-О- α -L-рамнопиранозидом, кемпферол-3-О- β -D-галактопиранозил-6-О- α -L-рамнопиранозидом и трифолином.

Род *Astragalus* L. сем. Fabaceae объединяет около 2200 видов, распространенных по всему земному шару. На территории СНГ встречается 849 видов, относящихся к 9 под родам и 103 секциям, которые распространены почти во всех климатических зонах: от Арктики до южных границ, из них на Кавказе встречается около 235 видов [1, 2, 3].

Растения рода *Astragalus* L. издавна применяются в народной медицине при различных заболеваниях. Содержащиеся в астрагалах биологически активные вещества обеспечивают широкий спектр фармакологических эффектов: успокаивающий, гипотензивный, сосудорасширяющий, кардиотонический, диуретический, гипоазотемический, гиполипидемический и др.

Некоторые виды астрагалов нашли применение в официальной медицине. На основе

биологически активных веществ *A. falcatus* L. разработан препарат «Фларонин», который содержит флавоноид робинин и оказывает гипоазотемическое действие. Астрагалегозид, который выделен из *A. galegiformis* L., в эксперименте также проявляет высокую гипоазотемическую активность [4].

Изучались фармакологические свойства как индивидуальных флавоноидов астрагалов, так и их суммарных комплексов. Ряд авторов отмечают гипотензивное действие сумм флавоноидов *A. frogidus* L., *A. Gray* L., *A. penduliflorus* Lam., *A. levieri* Freyn, *A. sevangelensis* Grossh., *A. suffruticosus* DC., *A. tenuis* Turch. Густой экстракт из травы *A. flexus* Fisch., который содержит комплекс фенольных соединений: флавоноиды, оксикоричные кислоты, в эксперименте проявляет гипотензивные свойства [5, 6, 7, 8, 9]. Настой из тра-

вы *A. dasyanthus* Pall. используется для лечения гипертонии [10].

Сумма фенольных соединений *A. sevan-gensis* Grossh., *A. arguricus* Bung, *A. levieri* Freyn, оказывают нейролептическое действие [11]. Сумма флавоноидов некоторых видов астрагалов в эксперименте проявляет противовоспалительные свойства и Р-вита-минную активность [12].

Флавоноиды *A. pubiflorus* DC. имеют спаз-молитическую активность [13]. Сумма флаво-ноидов *A. penduliflorus* Lam. входит в состав препарата гипотензивного действия, приме-няемого в Монголии, и рекомендуется для лечения гипертонии, которая сопровождается коронарной недостаточностью [14, 15]. Экстракт надземной части *A. adsurgens* Pall., который содержит флавоноиды, оказывает антибактериальное, диуретическое действие, применяется при сердечно-сосудистых забо-леваниях [8]. Сумма флавоноидов *A. alpinus* L. и *A. onobrychium* L. в эксперименте проявля-ют гипополипидемические свойства [16].

A. Johanna L. в химическом и фармаколо-гическом аспектах изучен недостаточно. В продолжение ранее начатых исследований по изучению астрагала Йоганна [17] в данной работе приведены данные по выделению, ус-тановлению строения и количественному оп-ределению флавоноидов в надземной части.

Объекты и методы исследования

Сырье для исследования было заготовле-но в окрестностях г. Баку в период цветения. Выделение флавоноидов проводили по мето-дике, описанной в [17]. При дальнейшем элю-ировании водным этанолом из колонки с по-лиамидным сорбентом из 70 % спиртового извлечения астрагала Йоганна выделены, кроме робинина [17], вещества, условно обо-значенные А-1 — А-3, А-5 — А-7.

Структуру выделенных веществ устанав-ливали с помощью спектральных, физичес-ких и химических методов в сравнении с до-стоверными образцами [18, 19]. Для изучения флавоноидных гликозидов проводили кис-лотный гидролиз фракций в мягких и жест-ких условиях — кислотой серной 0.5 % и 5 %. Ферментный гидролиз проводили эстеразами виноградной улитки. Пробы отбирали через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин, 90 мин, 120 мин и хроматографировали в системах н-бута-нол - кислота уксусная - вода (4:1:2), 15 % кис-лота уксусная, бензол - этилацетат - кислота уксусная - вода (БЭУВ) (50:50:1:1), ацетон - н-бутанол - вода (7:2:1).

Спектры выделенных веществ записыва-ли на спектрофотометре СФ-46 в области от 220 нм до 650 нм, на приборе UR-20 (фирма «Carl Zeiss») в области (700-4000) см⁻¹, на при-боре «Hytachy-Perkin-Elmer» с рабочей частотой 60 МГц, на приборе «Bruker» WP-100 в ДМСО-*d*₆, внутренний стандарт тетраметил-силан (ТМС). Положение гидроксильных групп определяли по данным спектрального анализа с применением ионизирующих и комплексообразующих реактивов [19]. Тем-пературу плавления флавоноидов определя-ли на блоке Кофлера.

Количественное определение флавонои-дов. 1.0 г (точная навеска) травы астрагала Йоганна, измельченной до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диа-метром 1 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляли 100 мл 70 % спирта и взвешивали с точностью до 0.01 г. Колбу присоединяли к обратному холодиль-нику, нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин с момента закипания, перио-дически встряхивая частицы со стенок. Затем колбу охлаждали и, при необходимости, до-водили до первоначальной массы 70 % спир-том. Извлечение фильтровали через бумаж-ный фильтр, отбрасывая первые 20 мл филь-трата. 3 мл фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 2 % раствора хлорида алюминия в 96 % спир-те и объем раствора доводили 96 % спиртом до метки. Через 30 мин измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 3 мл извлечения, 1 капли раз-веденной кислоты хлористоводородной и до-веденный 96 % спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно в тех же условиях измеряли оптическую плотность раствора, содержаще-го 1 мл 0.005 % раствора стандартного образ-ца рутин, приготовленного аналогично ис-пытуемому раствору.

Содержание суммы флавоноидов, в про-центах, в пересчете на рутин и абсолютно су-хое сырье, вычисляли по формуле:

$$\frac{D \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 100 \cdot 3 \cdot 25 \cdot (100 - W)} =$$

$$= \frac{D \cdot m_0 \cdot 10000}{D_0 \cdot m \cdot 3 \cdot (100 - W)}$$

где:

Таблица 1

Спектральная характеристика флавоноидов, выделенных из травы астрагала Йоганна, в УФ-области

Шифр соединения	Полосы поглощения	Нейтральный раствор в 96% спирте (λ)	Нейтральный спиртовой раствор в 96 % спирте с добавлением									
			+ натрия ацетат		+ натрия ацетат + кислота борная		+ цирконила хлорид		+ цирконила хлорид + кислота лимонная		+ этилат натрия	
			λ	Δλ	λ	Δλ	λ	Δλ	λ	Δλ	λ	Δλ
Флавоноидные агликоны												
А-5	I	367	387	+20	365	-2	450	+83	419	+52	416	+49
	II	266	285	+19	267	+1	268	+2	269	+3	279	+13
А-6	I	370	385	+15	383	+13	461	+91	428	+59	320	-50
	II	256	274	+18	264	+8	270	+14	265	+9	250	-6
А-7	I	370	380	+10	371	+1	430	+60	428	+58	420	+50
	II	265 254	274	+20	254	0	267	+13	267	+13	267	+13
Флавоноидные гликозиды												
А-1	I	367	387	+20	365	-2	450	+83	419	+52	416	+49
	II	270										
А-2	I	355	375	+20	365	+10	385	+30	355	0	400	+45
	II	265	270	+5	265	0	270	+5	265	0	280	+15
А-3	I	355	400	+45	355	0	405	+50	355	0	410	+55
	II	268	280	+12	268	0	285	+17	268	0	280	+12

Таблица 2

Данные ИК- и ПМР-спектрального анализа флавоноидов, выделенных из травы астрагала Йоганна

Вещество и его шифр	Полосы поглощения в ИК-области, ν см ⁻¹			Химические сдвиги протонов в м.д. (δ шкала), Гц					
	C=O	-OH	C=C ароматического кольца	H-2' H-6'	H-3' H-5'	H-8	H-6	H-1 углеводной части	углеводная часть
Флавоноидные агликоны									
кемпферол - 3,5,7,4'-тетраоксифлавонон (А-5)	1659	3370-3200	1615, 1600, 1568, 1510	7.90 (д. I 8)	6.80 (д. I 8)	6.24 (д. I 2.5)	6.11 (д. I 2.5)	-	-
кверцетин - 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонон (А-6)	1665	3385-3300	1612, 1560, 1518	7.68, 7.58, 7.28 (д. I 2.5)	6.80 (д. I 8)	6.43 (д. I 2.5)	6.10 (д. I 2.5)	-	-
изорамнетин - 3,5,7,4'-тетраокси-3'-метоксифлавонон (А-7)	1658	3455	1605, 1565, 1505, 2895*	7.59, 7.53 (д. I 2.5)	6.82 (д. I 9)	6.24 (д. I 2.5)	6.23 (д. I 2.5)	OCH ₃ 3.86* с	-
Флавоноидные гликозиды									
кемпферол-7-О-α-L-рамнопиранозид (А-1)	1640	3460-3030	1575, 1540, 1520	8.21 (д. I 8.5)	7.06 (д. I 9)	6.94 (д. I 2.5)	6.53 (д. I 2.5)	5.67 (д. I 1)	4.0-2.8 м
кемпферол-3-О-β-D-галактопиранозил-6-О-α-L-рамнопиранозид (А-2)	1670	3400-3100	1623, 1570, 1520	8.04 (д. I 8)	6.96 (д. I 8)	6.41 (д. I 2)	6.18 (д. I 2)	5.30 (д. I 8) 4.40 с ушир.	4.0-3.0 CH ₃ - 1.06 (д. I 6)
трифолин - кемпферол-3-О-β-D-галактопиранозид (А-3)	1660	3430-3180	1610, 1580, 1515	7.96 (д. I 8,5)	6.79 (д. I 8.5)	6.26 (д. I 2.5)	6.13 (д. I 2)	5.65 (д. I 2)	3.89-3.37

* - сигналы метоксильной группы

- D — оптическая плотность испытуемого раствора;
 D_0 — оптическая плотность раствора стандартного образца рутина;
 m — масса навески сырья, в граммах;
 m_0 — масса навески рутина, в граммах.
 W — потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Приготовление раствора стандартного образца рутина. Около 0.05 г (точная навеска) рутин-стандарта (ФС 42-2508-87), предварительно высушенного при температуре 130 — 135 °С в течение 3 часов, растворяли в 85 мл 96 % спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждали, доводили объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивали (1 мл раствора стандартного образца содержит 0.0005 г рутина).

Приготовление 2 % раствора алюминия хлорида в 96 % спирте. 2 г алюминия хлорида (х.ч. или ч.д.а., ГОСТ 3759-75) растворяли в 50 мл 96 % спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводили объем раствора тем же спиртом до метки.

Результаты и их обсуждение

Качественными реакциями и хроматографическим анализом было определено, что в 70 % спиртовом извлечении из травы астрагала Йоганна содержится не менее 11 веществ фенольной природы. 7 веществ по подвижности на хроматограммах, флуоресценции в УФ-свете, окрашиванию со специфическими реактивами можно отнести к флавоноидам (А-1 — А-3, А-5 — А-7), 4 — к производным оксикоричных кислот. Методом хроматографии на полиамидном сорбенте из травы астрагала Йоганна, кроме описанного ранее робинина (А-4) [17], выделены еще 6 флавоноидов А-1 — А-3, А-5 — А-7.

Флавоноидная природа исследуемых веществ А-1 — А-3, А-5 — А-7 подтверждается с помощью качественных реакций, анализа ИК- и УФ-спектров (Табл. 1, 2). По подвижности на хроматограммах, цианидиновой реакции по Брианту (окрашен водный слой) вещества А-1 — А-3 можно отнести к гликозидам, А-5 — А-7 к агликонам. В ИК-спектрах обнаруживаются полосы поглощения в области (3385 — 3100) см⁻¹ (фенольные гидроксилы); (1670 — 1640) см⁻¹ (карбоксыльная группа γ -пиронового цикла) — спектры, характерные для большинства производных флавоноидов (Табл. 2).

Перечисленные вещества на хроматограммах обнаруживаются по ярко-желтой (А-1), желтой (А-5 — А-7) и темно-коричневой (А-2 — А-3) флуоресценции пятен в УФ-свете, переходящей в различные оттенки желтого цвета под действием паров аммиака, растворов щелочей, солей алюминия и циркония.

Темно-коричневая флуоресценция в УФ-свете позволяет отнести вещества А-2 — А-3 к производным флавонов или флавонолов с замещенной оксигруппой у С-3 γ -пиронового ядра, вещество А-1 с ярко-желтой флуоресценцией нами отнесено к производным флавонолов со свободной оксигруппой у С-3 [18].

Сравнивая интенсивность максимумов длинноволновой и коротковолновой полос поглощения I и II в УФ-спектрах (Табл. 1), установили, что у исследуемых веществ максимум II полосы поглощения несколько интенсивнее максимума I полосы, что явилось основанием для отнесения их к производным флавонола [18, 19]. Это подтверждается и результатами качественных реакций. Сравнивая окраску восстановленных продуктов цианидиновой реакции следует отметить, что исследуемые флавоноиды давали ярко-вишнево-красные цвета, что подтверждает их флавоноидную природу [20].

На основании изучения физико-химических свойств, УФ-, ИК-, ПМР-спектров, сравнения с достоверными образцами вещество А-5 идентифицировали с кемпферолом, А-6 — кверцетином, А-7 — изорамнетином [21].

При изучении конечных продуктов гидролиза и динамики гидролиза методом хроматографии на бумаге в системе БУВ (4:1:2) установили, что вещество А-1 для полного расщепления требуют довольно жестких условий, вещества А-2, А-3 сравнительно легко гидролизуются в более мягких условиях. Вещество А-1 легко гидролизует 0.5 % раствором калия гидроксида, что дает основание предположить локализацию углеводного заместителя у С-7.

В продуктах гидролиза веществ А-1 — А-3 обнаружены агликон, который идентифицировали с кемпферолом, и сахара: L-рамноза у гликозида А-1, D-галактоза и L-рамноза у гликозида А-2 и D-галактоза у гликозида А-3.

В ПМР-спектрах (Табл. 2) обнаруживаются сигналы при σ 8.21 м.д.; 8.04 м.д.; 7.96 м.д., что соответствует протонам Н-2', Н-6'; сигналы при σ 7.06 м.д.; 6.96 м.д.; 6,79 м.д. обуслов-

лены протонами Н-3', Н-6'; протон Н-8 резонирует в области (6.94 – 6.26) м.д., протоны Н-6 – (8.53 – 6.13) м.д.

В области (4.0 – 2.8) м.д. обнаруживается характерная группа сигналов углеводного остатка, интегральный подсчет которых показывает наличие 6 протонов (вещества А-1, А-3), что подтверждает их монозидную природу, и 12 протонов для биозида А-2. Аномерный протон L-рамнозы у вещества А-1 несколько смещен в область слабых полей 5.67 м.д. и обнаруживается в виде хорошо выраженного дублета с константой расщепления 1 Гц, что подтверждает α-конфигурацию гликозидной связи. Аномерный протон у С-1 галактозы дает дублет при 5.85 м.д. с J=7 Гц, что свидетельствует о С-3 замещении у гликозида А-3 и наличии β-гликозидной связи.

В ПМР-спектре гликозида А-2 наряду с ароматическими протонами (Табл. 2) отмечаются сигналы двух аномерных протонов углеводных остатков: при σ 5.3 м.д. (J=8 Гц) D-галактозы и уширенный сигнал при σ 4.40 м.д. L-рамнозы.

Продукт мягкого кислотного гидролиза гликозида А-2 соответствовал веществу А-3. Проведенные исследования, сравнение физико-химических свойств, отсутствие депрессии температуры плавления с достоверными образцами позволили идентифицировать выделенные гликозиды:

А-1 как кемпферол-7-О-α-L-рамнопиранозид; А-2 – кемпферол-3-О-β-D-галактопиранозид-6-О-α-L-рамнопиранозид; А-3 - кемпферол-3-О-β-D-галактопиранозид (трифоллин).

Вещества А-1 — А-3, А-5 — А-7 впервые выделены из *Astragalus Johanna* L.

Исходя из качественного состава флавоноидов, содержащихся в траве астрагала Йоганна, совпадение максимумов поглощения исследуемого извлечения и рутина в реакции комплексобразования с хлоридом алюминия позволили нам провести количественное определение флавоноидов в пересчете на рутин [22]. Результаты анализа представлены в Табл. 3.

Как видно из Табл. 3, содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, в траве астрагала Йоганна составляет (1.94±0.06) %.

Выводы

1. Впервые из травы астрагала Йоганна выделено 6 флавоноидов: кемпферол, кверцетин, изорамнетин, кемпферол-7-О-α-L-рамнопиранозид, кемпферол-3-О-β-D-галактопиранозид-6-О-α-L-рамнопиранозид и трифоллин и установлена их структура.

2. В траве астрагала Йоганна определено содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, которое составляет (1.94±0.06) %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алания М.Д., Кемертелидзе Э.П., Комиссаренко Н.Ф. Флавоноиды некоторых видов *Astragalus* L. флоры Грузии // Тбилиси: Мецниереба, 2002 – 151 с.
2. Жизнь растений: В 6 т. / Под ред. А.Л. Тахтаджана. - М.: Просвещение, 1982.
3. Рейва П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника: В 2 т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – Т.2. - 344 с.
4. Алания М.Д. Флавоноиды и циклоартаны астрагалов, произрастающих в Грузии. Автореф. дис. ... доктора фармацевт. наук: 15.10.02. - Тбилиси, 1990. – 45 с.
5. Біологічно активні речовини деяких видів роду *Astragalus* L. флори України / Комісаренко А.М., Ковальова А.М., Комісаренко М.Ф., Комісаренко С.М., Стремлюхов О.О. // Клінічна фармація. – 1998. – Т. 2, № 3. – С. 83 – 88.
6. Блинова К.Ф., Балангова Л.К. К фитохимическому изучению некоторых представителей рода *Астрагал* - *Astragalus* L. // Вопросы фармакогнозии. – Л., 1968. – Вып. 5. – С. 113 – 123.
7. Гипотензивная активность суммарных фенольных соединений из некоторых видов астрагалов / Казаков А.Л., Ивашов М.Н., Лукьянчиков М.С., Гужва Н.Н., Лысенко Т.А. // Тез. докл. II Респ. конф. по мед. ботанике – Киев, 1988. – С. 244 – 245.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Hydrangeaceae* - *Haloragaceae*. - Л.: Наука, 1987. – 326 с.
9. Hikino H., Funajama Sh., Endo K. Hypotensive principle of *Astragalus* and *Hedysarum* roots // *Planta med.* – 1976. – Bd. 30, N. 4. – S. 297 – 388.
10. Действие на сердечно-сосудистую систему химических веществ, выделенных из *Астрагала шерстистоцветкового* / Белова Л.Ф., Гурова А.Д., Хоронько А.Г., Глызин Б.И. // *Здравоохранение Белоруссии.* – 1974. – Т. 20, № 2. – С. 12 – 14.
11. Нейролептическая активность полифенольных соединений растений рода *астрагал* / Гужва Н.Н., Саркилов Л.С., Ивашев М.Н., Зайцев В.П. // *Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных*

Таблица 3

Количественное определение флавоноидов в траве астрагала Йоганна

Метод количественного определения	Количественное содержание	Статистическая обработка
Сумма флавоноидов, в пересчете на рутин, %		
спектрофотометрический	1.94 ± 0.06	$s = 0.056, S_x^2 = 0.023, P = 0.95, t(0.94; 4) = 2.78,$ $\Delta_x = 0.063, \bar{x} = 3.24 \%, a = 1.94 \pm 0.06$

- средств: Тез. докл. Всесоюзной конф. — М., 1991. — Т. 2. - Ч. 2 — С. 28 — 29.
12. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. - 5-е изд., перераб. и доп. — Новосибирск: Наука, 1991. — 431 с.
13. Дерюгина Л.И. Фитохимическое исследование некоторых видов атрагалов: Автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. — Харьков, 1967. — 23 с.
14. Дунгендорж Д. Изучение флавоноидных соединений некоторых видов рода астрагал (*Astragalus* L.), применяемых в народной медицине Монголии: Автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. — М., 1978. — 23 с.
15. Fang Sh. Studies of active principles of *Astragalus mongholicus* Bunge // *Yonji Huaxue*. — 1982. — No. 1. — P. 26—31; *Chem. Abstr.* — 1982. — V. 96. — N 177941.
16. Полифенольные соединения некоторых видов сем. бобовых и их биологическая активность / Казаков А.Л., Компанцев В.А., Лукьянчиков М.С. и др. // Тез. докл. IV Всесоюзного симпозиума по фенольным соединениям. — Ташкент, 1982. — С. 20 — 21.
17. Сулейманов Т.А. Выделение, идентификация и количественное определение робинина в цветках *Astragalus Johannis* // *Азерб. фармацевт. журн.* - 2003. - № 2. — С. 22 — 24.
18. Максютин Н.П., Литвиненко В.И. Методы выделения и исследования флавоноидных соединений // *Фенольные соединения и их биологические функции*. — М.: Наука, 1968. — С. 7 — 28.
19. Harborne J.B., Mabry T.J. The flavonoids. *Advances in research*. — London: Chapman and Hall, 1994. — No. 4. — 885 p.
20. Солодовниченко Н.М., Журавльов М.С., Ковальов В.М. Лікарська рослина сировина та фітопрепарати: Посіб. з фармакогнозії з основами біохімії лікар. рослин. - Харків: Вид-во НФАУ: Золоті сторінки, 2001. - 408 с.
21. Ковалев В.Н., Шестко И.Э., Карпенко В.А. Флавоноиды *Lathyrus sativus* // *Химия природных соединений*. - 1991. - № 3. — С. 424 — 425.
22. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье // *МЗ СССР*. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с.

Резюме

Сулейманов Т.А.

Флавоноїди *Astragalus Johanna* L.

У статті викладено результати фітохімічних досліджень із виділення, встановлення будови, кількісного визначення флавоноїдів у траві астрагала Йоганна. Флавоноїди представлені кемпферолом, кверцетином, ізорамнетином і глікозидами: кемпферол-7-О- α -L-рамнопіранозидом, кемпферол-3-О- β -D-галактопіранозил-6-О- α -L-рамнопіранозидом і трифоліном.

Summary

Suleymanov T.A.

Flavonoids of *Astragalus Johanna* L.

In this article the results of phytochemical research on isolation, structure determination and quantitative analysis of *Astragalus Johanna* herb flavonoids are presented. The flavonoids have been identified as kaempferol, quercetin, and isorhamnetine, and their glycosides: kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside, kaempferol-3-O- β -D-galactopyranosyl-6-O- α -L-rhamnopyranoside and trifoline.

Сулейманов Тахир Аббасали Оглы (р. 1963).

Окончил Азербайджанский медицинский университет (1986). Доцент (2002) кафедры фармакогнозии и ботаники Азербайджанского медицинского университета.

Фармакологічні дослідження

УДК 615.03

Иванов Л.В.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Мембранотропные свойства лекарственных веществ. Проблемы поиска, скрининга и биодоступности

Методом флуоресцентных зондов изучены мембранолипотропные свойства ряда местных анестетиков, карденолидов, их производных и флавоноидов. Рассчитаны константы диссоциации K_A с липосомами. Проведен анализ взаимосвязи между мембранолипотропными свойствами, фармакологической активностью и параметрами фармакокинетики. Полученные данные свидетельствуют о возможности поиска и скрининга новых лекарственных веществ, исходя из их мембранотропных свойств.

Известно, что фармакологическая активность многих лекарственных веществ (ЛВ) (местных анестетиков, антиаритмических веществ, антиоксидантов, ноотропных средств и др.) коррелирует с мембранотропными свойствами, если механизм действия этих веществ связан с их сродством к мембранам различных клеток [1-4].

По-видимому, в механизмах токсичности многих ЛВ их неспецифическое взаимодействие с мембранами клеток различных орга-

нов и тканей на пути транспорта от места введения к соответствующим рецепторам также играет существенную роль.

И, наконец, основные параметры фармакокинетики ЛВ: биодоступность (AUC и K_{01}), объем распределения по органам и тканям (V_p) и время удержания ЛВ в организме (MRT) напрямую зависят от способности лекарственного вещества взаимодействовать с мембранами тех или иных клеток [5, 6].

Таким образом, сродство лекарственного вещества к мембранам является фундаментальным свойством, которое во многих случаях определяет фармакологическую активность, а также основные фармакокинетические параметры ЛВ: биодоступность, объем распределения и время удержания в организме.

Однако, научных работ, в которых изучаются мембранотропные свойства для фармакокинетического скрининга и прогнозирования фармакокинетических свойств новых ЛВ, а также фармакокинетических исследований, проводимых параллельно с изучением мембранотропных свойств ЛВ с целью объяснения параметров фармакокинетики, крайне недостаточно.

Целью настоящей работы явилось изучение мембранолитотропных свойств ряда ЛВ,

а также анализ корреляций между мембранолитотропными свойствами, фармакологической активностью и параметрами фармакокинетики этих веществ, что может быть использовано для поиска, синтеза, скрининга новых ЛВ по их мембранотропным свойствам и создания конкурентноспособных лекарственных препаратов с заданными фармакокинетическими свойствами.

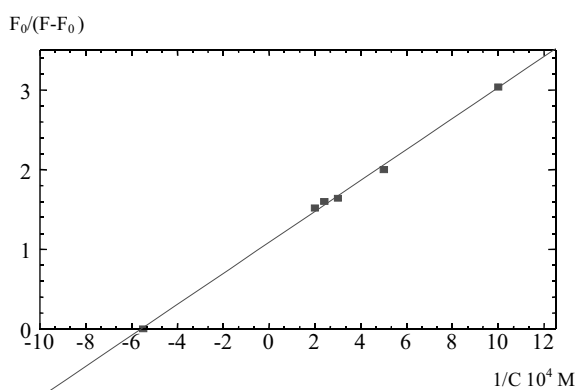
Материалы и методы

Для изучения механизмов связывания изучаемых веществ с липосомами использовали метод флуоресцентных зондов, широко применяющийся в молекулярной биологии и фармакологии, для изучения корреляции между мембранолитотропными свойствами ЛВ и параметрами фармакокинетики - фармакокинетические исследования [6, 7].

Объектами исследования являлись субстанции сердечных гликозидов, флавоноидов и местных анестетиков. В качестве флуоресцентного зонда использовали 1-анилинонафталин-8-сульфонат (1,8-АНС) производства фирмы «Serva» (Германия). Флуоресценцию зонда 1,8-АНС возбуждали при длине волны 365 нм, максимум интенсивности флуоресценции наблюдали при длине волны 475 нм. Зонд вводили в липосомы из его водного раствора. Конечная концентрация зонда в липосомах составляла 5 мкмоль [7]. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-2A».

Липосомы получали путем ультразвуковой обработки многослойных везикул из фосфатидилхолина с концентрацией 0.05 % на частоте 22 кГц в течение 10-15 мин при

Рисунок 1



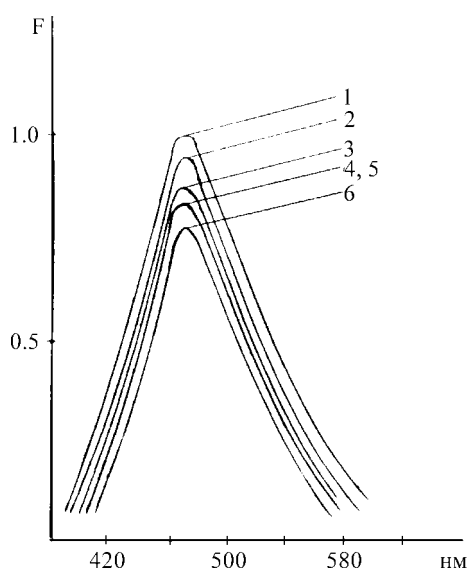
Определение K_d совкаина с липосомами графическим методом из данных флуоресценции зонда в липосомах

Таблица 1

Константы диссоциации ряда лекарственных веществ с липосомами

Лекарственное вещество	K_d (М)
новокаинамид	$6 \cdot 10^{-4}$
тримекаин	$1.25 \cdot 10^{-4}$
дикаин	$1.0 \cdot 10^{-4}$
пиромексин	$5.4 \cdot 10^{-5}$
совкаин	$1.8 \cdot 10^{-5}$
дигоксин	$1.6 \cdot 10^{-4}$
конваллятоксин	$1.0 \cdot 10^{-4}$
тринитроконваллятоксин	$5.0 \cdot 10^{-5}$
аймалин-строфантин-бромид	$1.4 \cdot 10^{-4}$
17- α - аймалин-строфантин-бромид	$2.5 \cdot 10^{-4}$
анаприлин	$1.25 \cdot 10^{-4}$
нитазол	$1.2 \cdot 10^{-4}$
хлотазол	$5.7 \cdot 10^{-4}$

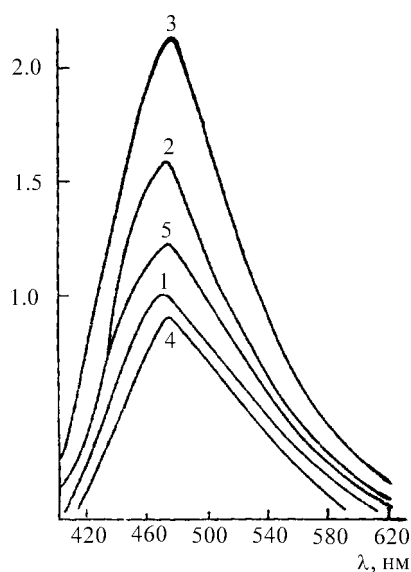
Рисунок 2



Спектры флуоресценции зонда 1,8-АНС в липосомах

1 — контроль; 2 — дигоксин;
3 — конваллятоксин; 4 — дигитоксин;
5 — строфантин; 6 — корельборин

Рисунок 3



Спектры флуоресценции зонда 1,8-АНС в липосомах

1 — контроль; 2 — 17-а АСБ; 3 — АСБ;
4 — строфантин; 5 — аймалин

температуре 4 °С в 0.1 М трис-буферном растворе pH 7.2 [6]. Константы диссоциации K_A изучаемых веществ с липосомами определяли из спектров флуоресценции графическим методом в обращенных координатах [8].

Результаты и обсуждение

Известно, что в механизме действия местных анестетиков ведущую роль играет способность этих веществ связываться с липидами мембран и определенным образом влиять на структуру мембран. Нами изучено сродство к липосомам ряда анестетиков, рассчитаны K_A , которые сравнивали с данными по фармакологической активности этих веществ.

На Рис. 1 представлены данные расчета K_A (графический метод) для анестетика совкаина из спектров флуоресценции зонда 1,8-АНС в липосомах в обращенных координатах. Рассчитанная K_A для совкаина составляет $1.8 \cdot 10^{-5}$ М. Значения K_A для других анестетиков представлены в Табл. 1.

Известно, что проводниковая активность анестетиков растет в ряду новокаинамид < кокаин < тримекаин < дикаин < пиромекаин < совкаин [9].

Сродство анестетиков к липосомам (по нашим данным) растет в ряду новокаинамид < тримекаин < дикаин < пиромекаин < совкаин.

Таким образом, для местных анестетиков наблюдается хорошая корреляция между их фармакологической активностью и мембранолипотропными свойствами.

Изучали сродство к липосомам карденолидов и их производных. Спектры флуоресценции зонда в липосомах в присутствии ряда гликозидов представлены на Рис. 2. Добавление гликозидов к липосомам приводило к уменьшению флуоресценции зонда вследствие его вытеснения из мембраны в воду молекулами сердечного гликозида. Уменьшение флуоресценции зонда пропорционально сродству изучаемых веществ к липосомам [6, 7]. Для дигоксина K_A составляла $1.6 \cdot 10^{-4}$ М (Табл. 1) [6].

Сродство сердечных гликозидов к липосомам уменьшалось в ряду корельборин > эризимин > строфантин > дигитоксин > конваллятоксин > дигоксин. В то же время биологическая активность сердечных гликозидов (мг/кг, на кошках) падала в ряду эризимин > конваллятоксин > корельборин > строфантин > дигоксин > дигитоксин [10].

Как видно из представленных данных, для сердечных гликозидов также наблюдается схожесть рядов, если исключить из ряда конваллятоксин. Известно, что механизм действия гликозидов связан с ингибированием Na,K-АТФазы, и сродство к мембранам имеет опосредованный характер, т.к. макромоле-

кула Na,K-АТФазы является интегральным мембранным белком [6]. Таким образом, для ЛВ, механизм действия которых напрямую не связан с мембранами, четкой корреляции между фармакологической активностью и мембранотропностью может не наблюдаться.

В ГП ГНЦАС синтезировали новое антиаритмическое и кардиотоническое средство, полученное полусинтетическим путем из алкалоида аймалина и сердечного агликона строфантидина, соединенных сложноэфирной связью (АСБ) [11, 12]. Изучали сродство АСБ, аймалина и строфантидина к липосомам и сравнительную фармакокинетику АСБ и аймалина. На Рис. 3 представлены спектры флуоресценции зонда в липосомах в присутствии изучаемых веществ.

Сродство АСБ к липосомам выше, чем у аймалина, т.к. остаток строфантидина в молекуле АСБ предоставляет дополнительные точки связывания с фосфолипидами мембран. Изучение фармакокинетики АСБ на крысах-самцах при внутривенном введении в дозе 20 мг/кг показало, что фармакокинетические данные можно формализовать в рамках двухчастевой модели [11, 12]. Кинетическая кривая описывается биекспоненциальным уравнением: $C(t) = 6.61 \cdot e^{-8.701t} + 2.51 \cdot e^{-0.329t}$. Рассчитаны фармакокинетические параметры для АСБ: $T_{0.5}^{\alpha} = 4.8$ мин; $T_{0.5}^{\beta} = 2.11$ ч; $k_{el} = 1.09$ ч⁻¹; $k_{12} = 5.31$ ч⁻¹; $k_{21} = 2.63$ ч⁻¹; $V_1 = 0.459$ л; $V_{ss} = 1.38$ л; $V_{\beta} = 1.59$ л; $AUC_{0-\infty} = 8.37$ мг·ч/л; $Cl = 0.500$ л/ч [11, 12].

Полученные данные свидетельствуют о том, что АСБ остается в организме более про-

должительное время по сравнению с аймалином, т.к. при внутривенном введении последнего мышам в дозе 10 мг/кг время полувыведения $T_{0.5}$ составляло 15.8 мин [13]. Таким образом, введение в молекулу аймалина остатка строфантидина приводит к увеличению мембранотропности АСБ, что, в свою очередь, увеличивает время жизни ЛВ в организме.

Изучение изомера АСБ - 17а-АСБ, у которого лактонное кольцо находится за плоскостью молекулы (α -положение) показало, что его сродство к липосомам заметно меньше, чем у АСБ (Табл. 1, Рис. 3). При этом его токсичность в несколько раз уменьшалась по сравнению с АСБ: LD_{50} для АСБ - 130 мг/кг, для 17-а АСБ - 820 мг/кг [12]. Уменьшение мембранотропных свойств указанных веществ вследствие изменения конформации их молекул коррелировало с их токсическими свойствами.

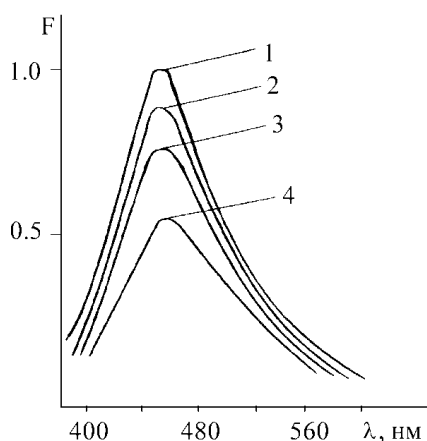
Большой интерес представляет изучение роли заместителей в молекулах ЛВ, их влияния на K_d и фармакологическую активность. В ГП ГНЦАС было получено производное конваллятоксина - тринитроконваллятоксин (ТНК), обладающее коронарорасширяющим и кардиотоническим действием [14]. Введение трех нитрогрупп в молекулу конваллятоксина привело к увеличению сродства ТНК к липосомам в 2 раза (Табл. 1). В то же время опыты с использованием кальцийхлорчувствительного зонда - хлортетрациклина [6] показали, что введение ТНК в липосомы приводит к уменьшению связывания ионов кальция липосомами, что согласуется с данными о коронарорасширяющем действии ТНК.

Изучали сродство ряда флавоноидов различной структуры — флавоноидных агликонов и гликозидов к мембранам липосом. Эти данные представлены на Рис. 4. Сродство флавоноидов к липосомам оценивали по падению флуоресценции флуоресцентного зонда 1,8-АНС вследствие его вытеснения из мембраны в воду молекулами изучаемых веществ.

Сродство флавоноидов к липосомам возросло в ряду кверцетин < мирицетин < гиперозид < стаханоацизид [6].

Анализ мембранотропных свойств ряда флавоноидов позволил объяснить двухфазный характер фармакокинетических кривых кверцетина, мирицетина, гиперозида в препарате «Гифларин» и байкалина в препарате «Зилинат» при их внутривенном введении. Наблюдалось заметное изменение парамет-

Рисунок 4



Спектры флуоресценции зонда 1,8-АНС в суспензии липосом в присутствии флавоноидов (10^{-3} М)

1 — контроль; 2 — кверцетин; 3 — гиперозид; 4 — стаханоацизид

ров фармакокинетики при переходе от флавоноидных агликонов кверцетина и мирицетина к гликозиду гиперозиду: увеличение времени удержания в организме в 2 раза и увеличение объема распределения периферического пула по сравнению с центральным пулом [6].

Определены закономерности и зависимости между структурой флавоноидов, их мембранотропными свойствами, влиянием на текучесть мембран и параметрами фармакокинетики. Так, увеличение сродства к мембранам флавоноидных гликозидов (гиперозид, стаханоацизид) по сравнению с агликонами (кверцетин и мирицетин) сопровождается увеличением их влияния на текучесть липидов мембран клеток тканей сосудов (гиперозид, стаханоацизид, ликвиритин), а также увеличением времени удержания в организме и объема распределения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что мембранолипотропные свойства лекарственных веществ чувствительны к изменениям структуры и конформации молекул, замены тех или иных химических групп в молекулах, а метод флуоресцентных зондов может эффективно использоваться для поиска, синтеза и скрининга новых лекарственных веществ.

Новым аспектом этой проблемы является возможность скрининга фармакокинетических свойств ЛВ с помощью оценки их мембранолипотропных свойств.

Выводы

1. Изучены мембранолипотропные свойства ряда лекарственных веществ: местных анестетиков, карденолидов и их производных, ряда флавоноидов. Для некоторых лекарственных веществ рассчитаны константы диссоциации с липосомами (K_d).

2. Для изучаемых веществ проведен анализ взаимосвязи между мембранолипотропными свойствами, фармакологической активностью и параметрами фармакокинетики.

3. Полученные данные свидетельствуют о возможности поиска и скрининга новых по фармакокинетическим свойствам ЛВ, исходя из их мембранолипотропных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Добрецов Г.Е., Лысковцев В.В., Векшин Н.А. Связь между структурой, сродством к фосфолипидным мембранам и антиаритмической активностью 10-ацилоаминопропионильных производных фенотиазина // Фармакология и токсикология - 1979. - № 2. - С. 23-26.
2. Особенности молекулярных механизмов действия местноанестезирующих средств / Резников К.М., Иса-

ева Г.А., Исаев П.П. и др // Человек и лекарство: Тез. докл. X Российского национального конгресса. - М., 2003. - С. 653.

3. Сравнительная характеристика взаимодействия некоторых нестероидных противовоспалительных средств с биомембранами при экспериментальном воспалении / Могилевич С.Е., Кульчицкий А.Г., Воловик З.Н. и др. // Фармакология и токсикология. - 1989. - Т. 52, № 4. - С. 59-61.

4. К вопросу о мембранных механизмах действия ноотропных препаратов / Семин И.Г., Семин И.И., Азангеев Н.М. и др. // Биологические мембраны. - 2001. - № 5. - С. 363-369.

5. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филос В.А. Фармакокинетика. - М: Медицина, 1980. - 423 с.

6. Иванов Л.В., Орлова И.Н. Биофармацевтические исследования, направленные на оптимизацию состава, свойств и пути введения лекарственных препаратов // Технология и стандартизация лекарств. - Харьков: РИРЕГ, 2000. - Т. 2. - С. 558-615.

7. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М.: Наука. - 1980. - 320 с.

8. Э. Маршелл. Биофизическая химия. - М.: Мир, 1981. - Т.1 - С. 82.

9. Руководство по фармакологии / Под ред. Лазарева Н.В. - Ленинград: Медгиз, 1961. - Т 1. - 612 с.

10. Карденолиды и буфадиенолиды / Макаревич И.Ф., Кемертелидзе Э.П., Кисличенко С.Г. и др. // Тбилиси: Мецниереба, 1975. - 227 с.

11. Фармакокинетика, метаболизм и сродство к липидам биомембран аймалин-строфантин бромид / Иванов Л.В., Хаджай Я.И., Макаревич И.Ф. и др. // Фармакокинетические исследования при создании и применении лекарственных средств: Тез. докл. II Всесоюзной конф. по фармакокинетике. - Каунас, 1987. - С. 135-137.

12. Алкалоидкарденолиды / Макаревич И.Ф., Иванов Л.В., Хаджай Я.И. и др. // Химия природных соединений. - 1985. - № 2. - С. 239-244.

13. Naumyn-Schmiedebregs I.H. Pharmacokinetics research aimaline // Arch. Pharmacol. - Vol. 298, No 1. - P. 43-50.

14. Конваллятоксин-2,3-4-три-о-нитрат, проявляющий кронорасширяющее и кардиотоническое действие: А.с. 1181289. СССР, МКА. / Макаревич И.Ф., Мокроуз М.В., Конев В.Ф., Пичугин В.В., Толчий Л.Я., Иванов Л.В., Митченко П.П., Монахов В.Б., Соколова В.Е. - № 3706428; Заявлено 15.12.1983 // Открытия и изобретения. - 1985. - № 35.

Резюме

Иванов Л.В.

Мембранотропні властивості лікарських засобів. Проблеми пошуку, скринінгу та біодоступності

Методом флуоресцентних зондів вивчено мембранолипотропні властивості ряду місцевих анестетиків, карденолідів та їх похідних, флавоноїдів. Розраховані константи дисоціації K_d із ліпосомами. Проведено аналіз взаємозв'язку між мембранолипотропними властивостями, фармакологічною активністю та параметрами фармакокинетики. Одержані дані свідчать про можливість пошуку та скринінгу нових лікарських речовин, виходячи з їх мембранотропних властивостей.

Summary

Ivanov L.V.

Membranotropic properties of medicinal substances. Problems of retrieval, screening and bioavailability

The membranolipotropic properties of some local anesthetics, cardenolides and their derivatives, and flavonoids

were studied by fluorescent probe method. The dissociation constants K_D with liposomes have been calculated. An analysis of interrelation between the membranotropic properties, pharmacological activity and pharmacokinetics parameters has been carried out. The data obtained demonstrate the possibility of retrieval and screening of the new medicinal substances depending on their membranotropic properties.

УДК 615.03

Орлова И.Н.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Сравнительные экспериментальные фармакокинетические исследования препаратов троксерутина

В экспериментах на кроликах изучена фармакокинетика лекарственных форм троксерутина «Троксерутин – КМП», капсулы, 300 мг; «Троксевазин», капсулы, 300 мг, и «Венозид», гель 2 %; «Троксевазин», гель 2 %. Показано, что при однократном внутривенном введении троксерутина в форме капсул происходит его постепенное всасывание в системный кровоток с последующим хорошим распределением в ткани организма и элиминацией в течение 1 сут. Капсулы «Троксевазин» характеризуются более полной биодоступностью по сравнению с капсулами «Троксерутин-КМП». При кожном нанесении в форме гелей троксерутин относительно медленно проникает через кожный барьер, что обеспечивает его длительную циркуляцию в крови, лекарственное средство в значительной степени распределяется и накапливается в тканях. Гели «Венозид» и «Троксевазин» являются фармакокинетически эквивалентными препаратами местного действия. Фармакокинетика троксерутина зависит от вида лекарственной формы и способа введения. Уровень концентрации троксерутина в крови при внутривенном введении в форме капсул на порядок выше, чем при кожном нанесении в форме геля, что обеспечивает более высокую системную биодоступность троксерутина при пероральном применении.

Заболевания венозной системы являются распространенной группой заболеваний. По данным медицинской статистики, хронической венозной недостаточностью вен нижних конечностей страдает около 20 % населения [1, 2, 3].

Для фармакотерапии заболеваний венозной системы широко используют лекарственные средства общего и местного действия. Особого внимания заслуживают препараты на основе флавоноидов и их производных, эффективность и безопасность которых доказаны многолетними клиническими исследованиями. В основе молекулярных механизмов действия флавоноидов лежит их способность подавлять аутоагрессивность лейкоцитов и макрофагов, а также блокировать синтез местных медиаторов воспаления [4].

Препараты на основе троксерутина обладают ангиопротекторными свойствами, уменьшают сосудисто-тканевую проницаемость, способствуют нормализации микроциркуляции и трофики тканей, уменьшают застойные явления в венах, оказывают противоотечное и противовоспалительное действие [5].

Известно большое число зарегистрированных препаратов на основе троксерутина, которые имеют различные фирменные на-

Иванов Леонид Викторович (р. 1947). Окончил Харьковский государственный университет (1971). К.х.н. (1979). Ст. научн. сотр. лаборатории экспериментальной фармакологии, биоэквивалентности и токсикокинетики ГП ГНЦЛС.

звания (Троксерутин, Троксевазин, Венорутон и др.). Поэтому возникает проблема рационального выбора необходимого препарата, а также проблема их взаимозамены, поскольку такие важные характеристики, как время наступления эффекта, его сила и продолжительность в значительной степени зависят от биофармацевтических свойств лекарственной формы [6, 7].

Целью данной работы явилось сравнительное фармакокинетическое исследование лекарственных форм троксерутина: «Троксерутин - КМП», капсулы, 300 мг (ОАО «Киевмедпрепараты»), «Венозид», гель 2 %, разработанный в ГП ГНЦЛС, и их импортные аналоги «Троксевазин», капсулы, 300 мг и «Троксевазин», гель 2 % (Болгария).

Материалы и методы

Фармакокинетику препаратов исследовали на кроликах массой тела 2 - 3 кг по показателям концентрации троксерутина, представляющего собой сумму оксиэтилированных рутозидов [5].

Капсулы «Троксерутин-КМП» и «Троксевазин» вводили однократно внутривенно в дозе 300 мг/кг (по троксерутину). Гели «Венозид» и «Троксевазин» наносили на предварительно депилированный участок

(10 см × 10 см) кожи спины кролика из расчета 5 г геля на 1 кг массы, что соответствует дозе троксерутина 100 мг/кг. Гель втирали в кожу стеклянным аппликатором в течение 3 мин.

Кровь для анализа отбирали из краевой вены уха в предварительно гепаринизированные пробирки по следующим схемам:

— при введении капсул — до введения капсул и через 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч и 24 ч после введения;

— при нанесении гелей — до нанесения геля и через 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч и 24 ч после аппликации.

Для получения плазмы кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Плазму депротенизировали метанолом. Надосадочную жидкость после фильтрации через патроны для жидкостной экстракции («Tetracon RP», Латвия) выпаривали досуха.

Для количественного определения в плазме крови троксерутина после введения капсул использовали модифицированный метод ВЭЖХ [8]. Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Милхром 4» в следующих условиях: хроматографическая колонка — Сепарон С 18, размером 64 мм × 2 мм, с размером частиц 5 мкм; подвижная фаза: вода — ацетонитрил — метанол — кислота уксусная (76:20:2:2); скорость подвижной фазы — 100 мкл/мин; длина волны детектирования — 266 нм.

Для определения концентрации троксерутина после нанесения геля использовали спектрофотометрический метод с батохром-

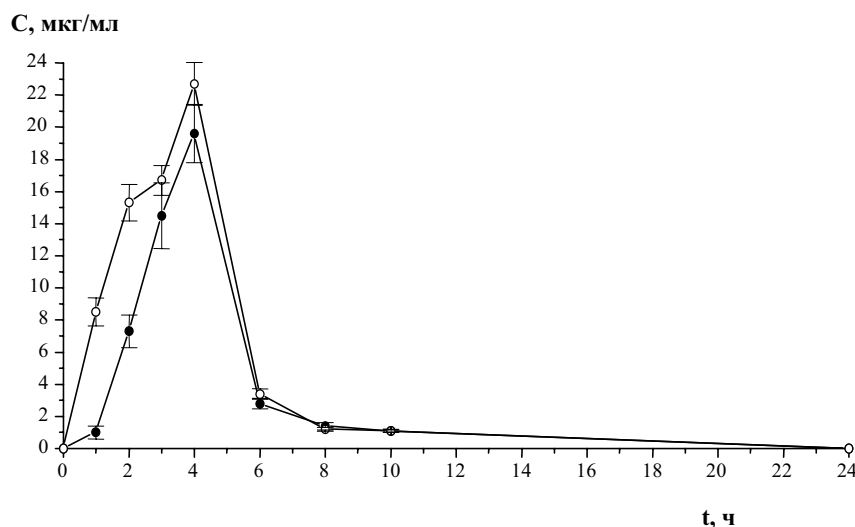
ным сдвигом [9]. Сухой остаток растворяли в 0.1 мл этанола, прибавляли 4.9 мл раствора хлорида алюминия (рН 4), нагревали в течение 10 мин, затем охлаждали и измеряли оптическую плотность при длине волны 420 нм на спектрофотометре СФ-46.

Фармакокинетические параметры рассчитывали модельно-независимым методом статистических моментов и линейно-частевым методом с использованием прикладных программ M-IND [10] и new het [11]. Рассчитывались следующие фармакокинетические параметры: максимальная концентрация - C_{max} , время ее достижения - T_{max} , константа скорости абсорбции - K_{01} , период полувсасывания - $T_{1/2}^{abs}$, кажущийся удельный объем распределения - V_d , константа элиминации - K_{el} , период полувыведения препарата - $T_{1/2}$, общий клиренс - Cl_t , среднее время удержания препарата в крови - MRT, площадь под фармакокинетической кривой в пределах от 0 до ∞ — $AUC^{0 \rightarrow \infty}$ и относительная биодоступность f , в процентах.

Результаты и их обсуждение

На Рис. 1 представлена динамика усредненных концентраций троксерутина после однократного приема капсул «Троксерутин-КМП» и «Троксевазин». Как видно, фармакокинетические кривые в целом аналогичны и характеризуются постепенным всасыванием троксерутина из желудочно-кишечного тракта в системный кровоток с $T_{max} = 4$ ч и максимальной концентрацией 19.6 мкг/мл и 22.7 мкг/мл для капсул «Троксерутин-КМП»

Рисунок 1



Фармакокинетические кривые троксерутина после перорального введения кроликам капсул «Троксерутин - КМП» (•) и «Троксевазин» (◦) в дозе 300 мг/кг

и «Троксевазин», соответственно. При этом стадия элиминации троксерутина из организма животного характеризуется фазами, связанными с быстрым перераспределением его в ткани и органы животных в течение 4-6 ч (α -фаза) и последующей более медленной элиминацией из организма (β -фаза) до 24 ч.

На фармакокинетических кривых отмечаются различия в скорости всасывания троксерутина на первых часах после введения капсул «Троксерутин-КМП» и «Троксевазин», выравнивающиеся к моменту достижения пиковых значений. Разница максимальных концентраций составляет 13.7 %. Статистический анализ результатов определения концентрации троксерутина при пероральном введении двух сравниваемых лекарственных форм показал, что для временных точек в интервале от 3 ч до 24 ч концентрации троксерутина достоверно не различаются ($p > 0.05$).

В Табл. 1 представлены фармакокинетические параметры троксерутина при его внутрижелудочном введении в форме капсул. Анализ приведенных данных показывает, что значения фармакокинетических параметров, характеризующих скорость всасывания троксерутина ($T_{max} = 4$ ч, $K_{01} = 1.05$ ч⁻¹ и 1 ч⁻¹, $T_{1/2}^{abs} = 0.66$ ч и 0.69 ч) для капсул «Троксерутин-КМП» и «Троксевазин» имеют значения, свидетельствующие о достаточно продолжительной абсорбции лекарственного вещества из желудочно-кишечного тракта в кровь с одинаковой скоростью этого процесса.

Среднее время удержания троксерутина в крови для капсул «Троксерутин-КМП» и «Троксевазин» имеет близкие значения, со-

ставляющие соответственно 4.7 ч и 4.1 ч, и указывает на длительность пребывания троксерутина в крови в отличие от других немодифицированных флавоноидов при внутрижелудочном введении [12, 13, 14].

Кажущийся удельный объем распределения троксерутина при введении капсул «Троксерутин-КМП» и «Троксевазин» характеризуется большими величинами (9.8 л/кг и 7.2 л/кг, соответственно). Это свидетельствует о значительном распределении лекарственного вещества в тканях, что связано с его выраженными сосудотропными свойствами и способностью накапливаться как с внутренней, так и с наружной стороны венозной стенки [15].

Параметры, характеризующие элиминацию троксерутина из крови ($K_{el} = 0.45$ ч⁻¹ и 0.46 ч⁻¹, $T_{1/2} = 1.5$ ч и 1.5 ч) для сравниваемых препаратов в форме капсул, имеют одинаковые значения и указывают на более медленную элиминацию по сравнению с другими флавоноидами [16].

Кажущийся удельный объем распределения троксерутина для капсул «Троксерутин-КМП» на 36 % больше, чем для капсул «Троксевазин», что приводит при почти одинаковых константах элиминации к более высоким значениям клиренса и более низким значениям площади под фармакокинетической кривой при введении капсул отечественного производства. Таким образом, при введении капсул «Троксерутин-КМП» и «Троксевазин» троксерутин всасывается с одинаковой скоростью, но в разной степени.

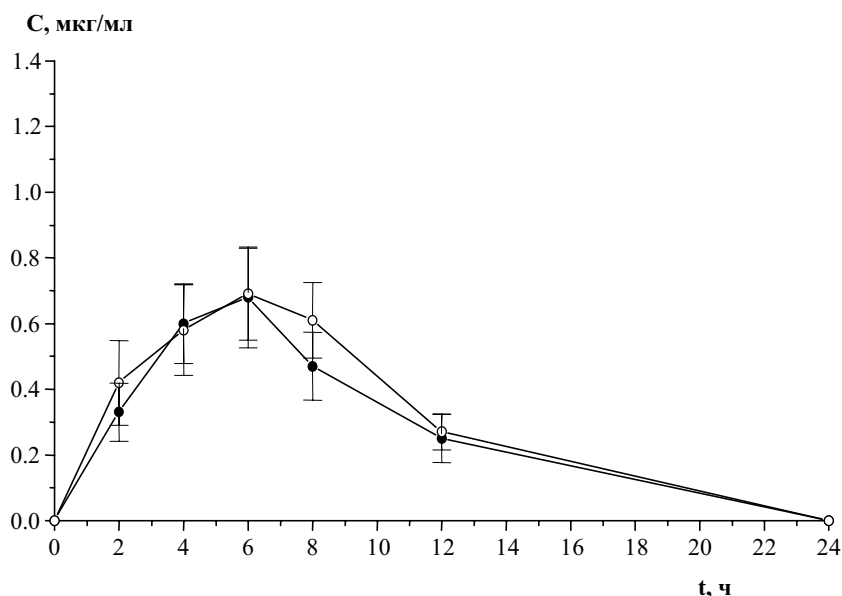
Относительная биодоступность троксерутина из капсул «Троксерутин-КМП» по сравнению с капсулами «Троксевазин» составля-

Таблица 1

Параметры фармакокинетики троксевазина при однократном пероральном введении кроликам капсул «Троксерутин-КМП» и капсул «Троксевазин» в дозе 300 мг/кг

Параметры фармакокинетики	Капсулы «Троксерутин-КМП»	Капсулы «Троксевазин»
C_{max} , мкг/мл	19.6	22.7
T_{max} , ч	4	4
K_{01} , 1/ч	1.05	1.00
$T_{1/2}^{abs}$, ч	0.67	0.69
K_{el} , 1/ч	0.45	0.46
$T_{1/2}$, ч	1.53	1.53
MRT, ч	4.67	4.05
V_d , л/кг	9.83	7.23
Cl , л/ч/кг	4.43	3.55
$AUC^{0 \rightarrow \infty}$, мкг·ч/мл	70.11	92.77
f , %	75.6	100

Рисунок 2



Фармакокинетические кривые троксерутина после кожного нанесения кроликам гелей «Венозид» (•) и «Троксевазин» (◦) в дозе 100 мг/кг

ет 76 %. Указанное позволяет сделать вывод, что капсулы «Троксерутин-КМП» и «Троксевазин» не являются фармакокинетически эквивалентными, что может быть связано с различиями в технологическом процессе производства лекарственных форм [17].

Результаты определения концентрации троксерутина в плазме крови кроликов после однократных кожных аппликаций геля «Венозид» и «Троксевазин» представлены на Рис. 2. На фармакокинетических кривых, профили которых практически идентичны, наблюдается относительно медленное всасывание троксерутина в системный кровоток с достижением максимальной концентрации

через 6 ч и последующей элиминацией его из организма. Максимальные концентрации троксерутина для изучаемых гелей равны (0.68 мкг/мл и 0.69 мкг/мл). На фармакокинетических кривых не отмечено резких пиковых подъемов, а с 4 ч по 8 ч фармакокинетические кривые имеют форму плато, обусловленного равной скоростью процессов всасывания и элиминации лекарственного вещества. В период с 8 ч по 24 ч наблюдается преобладание процессов элиминации троксерутина из крови.

В Табл. 2 представлены основные фармакокинетические константы троксерутина для гелей «Венозид» и «Троксевазин», имеющие

Таблица 2

Параметры фармакокинетики троксерутина при однократном кожном нанесении кроликам геля «Венозид» и геля «Троксевазин» в дозе 100 мг/кг

Параметры фармакокинетики	Гель «Венозид»	Гель «Троксевазин»
C_{\max} , мкг/мл	0.72	0.69
T_{\max} , ч	5.3	6
K_{01} , 1/ч	0.51	0.48
$T_{1/2}^{\text{abs}}$, ч	1.35	1.45
K_{el} , 1/ч	0.55	0.40
$T_{1/2}$, ч	1.59	1.76
MRT, ч	6.65	6.81
V_d , л/кг	47.79	47.31
Cl_t , л/ч/кг	24.13	17.75
$AUC^{0 \rightarrow \infty}$, мкг·ч/мл	6.13	6.78
f_s , %	90.4	100

близкие значения. При нанесении гелей трансдермальное всасывание троксерутина происходит постепенно и с одинаковой скоростью ($K_{01} = 0.51 \text{ ч}^{-1}$ и 0.48 ч^{-1} ; $T_{\max} = 5.3 \text{ ч}$ и 6 ч , соответственно). Такое всасывание обеспечивает длительную циркуляцию троксерутина в крови, о чем свидетельствуют значения среднего времени удержания ($MRT = 6.7 \text{ ч}$ для обоих гелей). Кажущийся удельный объем распределения имеет очень высокие значения ($V_d = 47.8 \text{ л/кг}$ и 47.3 л/кг , соответственно), которые свидетельствуют о распределении и накоплении троксерутина в тканях организма животного, в т. ч. и в пораженных участках. K_{el} (0.55 ч^{-1} и 0.40 ч^{-1}) и $T_{1/2}$ (1.59 ч и 1.76 ч) характеризуют скорость процессов биотрансформации, так как для троксерутина характерен внепочечный путь элиминации [9].

Степень относительной биодоступности (f') геля «Венозид» по сравнению с гелем «Троксевазин» составляет 90.4 %.

Проверка гипотезы о биоэквивалентности изучаемых гелей [17] показывает, что гели «Венозид» и «Троксевазин» являются фармакокинетически эквивалентными, что дает основание предполагать их фармакотерапевтическую эквивалентность.

Анализ полученных данных свидетельствует о наличии различий в фармакокинетике троксерутина у кроликов после нанесения гелей и введения капсул, заключающихся в более медленном всасывании троксерутина, низком уровне концентраций действующего вещества, отсутствии резких пиковых значений. Степень относительной биодоступности гелей «Венозид» и «Троксевазин» по сравнению с капсулами «Троксевазин» составляет 20 % и 22 %, соответственно, что характерно для препаратов местного действия.

Выводы

1. При однократном внутрижелудочном введении троксерутина в форме капсул происходит его постепенное всасывание в системный кровоток с последующим хорошим распределением в ткани организма и элиминацией в течение 1 сут. Капсулы «Троксевазин» характеризуются более полной биодоступностью по сравнению с капсулами «Троксерутин-КМП».

2. При нанесении в форме геля троксерутин относительно медленно проникает через кожный барьер, что обеспечивает его длительную циркуляцию в крови, лекарственное средство в значительной степе-

ни распределяется и накапливается в тканях. Гели «Венозид» и «Троксевазин» являются фармакокинетически эквивалентными препаратами местного действия.

3. Фармакокинетика троксерутина зависит от вида лекарственной формы и способа введения: уровень концентрации троксерутина в крови при внутрижелудочном введении в форме капсул на порядок выше (с учетом вводимой дозы), чем при нанесении гелей, что обеспечивает более высокую системную биодоступность препарата при пероральном применении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цубанова Н.А. К вопросу о фармакологии венозных патологий // Провизор. - 2003. - № 22. - С. 10-15.
2. Фізико-хімічні дослідження мазі для лікування тромбозу / Загорій Г.В., Чусшова О.А., Рубан О.А. та ін. // Вісник фармації. - 2002. - № 2. - С. 26-29.
3. Яковлева Л.В., Беркало Н.М., Загорій Г.В. Скринингові дослідження фармакологічних властивостей мазі для лікування тромбозу // Вісник фармації. - 2002. - № 2. - С. 128-131.
4. Богачев В.Ю. Системное лечение хронической венозной недостаточности // Репринт. - 2002. - Т. 2. - № 2. - С. 26-28.
5. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. - М.: АстраФармСервис, 2004. - 1488 с.
6. Георгиевский В.П. От химической субстанции через оптимальную лекарственную форму к эффективному и безопасному лекарственному препарату // Технология и стандартизация лекарств. - Харьков: РИРЕГ, 2000. - Т. 2. - С. 4-46.
7. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика. - М.: «Медицина», 1980. - 423 с.
8. Ditttrich P., Ostrovski J., Beubler E.E. et al. HPLC - Bestimmung von Troxerutin in Plasma und Harnnach oraler Gabe am Menschen // Arzneim. - Forsch. / Drug Res. - 1985. - Vol. 35 (I), No 24. - P. 765-767.
9. Tan S. I., Mowery P. J., Ritschnell W. A. et al. Spectrophotofluorometric analysis of 3', 4', 7 - tris [o -(β - hydroxyethyl)] rutoside in urine // J. Pharm. Sci. - 1978. - Vol. 67, No 8. - P. 1142-1144.
10. Пиотровский В.К. Метод статистических моментов и интегральные модельнонезависимые параметры фармакокинетики // Фармакология и токсикология - 1986. - № 5. - С. 118-127.
11. Расчеты фармакокинетических параметров лекарственных средств (линейно-частевые модели): Методические рекомендации. - Киев, 2003. - 19 с.
12. Анализ магнефирина в плазме крови и моче крыс методом ВЭЖХ / Геодакян С.В., Воскобойникова И.В., Колесник Ю.А. и др. // Фармация. - 1993. - № 1. - С. 70-72.
13. Воскобойникова И.В. Фармакокинетические исследования биологически активных ксантоновых и флавононовых соединений: Автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук: 15.00.02 / Моск. мед. академия. - М., 1993. - 27 с.
14. Ковальов В.Б., Ковган В.В., Колчина Е.Ю. Механізми лікувальної дії біофлавоноїду кверцетину // Укр. медичний альманах. - 1999. - Т. 2, № 4. - С. 176-184.
15. Patwardhan A., Caresson K., Poullain J.C. et al. The affinity of troxerutin for venous wall measured by laser scanning microscopy // J. Cardiovasc. Surg. - 1995. - Vol. 36, No 4. - P. 381-385.

16. Иванов Л.В., Орлова И.Н. Биофармацевтические исследования, направленные на оптимизацию состава, свойства и пути введения лекарственных препаратов // Технология и стандартизация лекарств. — Харьков: РИРЕГ, 2000. - Т. 2. - С. 279-334.

17. Надлежащие клинические исследования биоэквивалентности лекарственных средств: Методические рекомендации. — Киев, 2003. — 39 с.

Резюме

Орлова І.М.

Порівняльні експериментальні фармакокінетичні дослідження препаратів троксерутину

В експериментах на кроликах вивчена фармакокінетика лікарських форм троксерутину «Троксерутин — КМП», капсули, 300 мг; «Троксевазин», капсули, 300 мг, та «Венозид», гель 2 %; «Троксевазин», гель» 2 %. Показано, що при одноразовому внутрішньошлунковому введенні троксерутину у формі капсул відбувається його поступове всмоктування до системного кровотоку із подальшим добрим розподілом у тканини організму та елімінацією протягом 1д. Капсули «Троксевазин» характеризуються більш повною біодоступністю порівняно із капсулами «Троксерутин — КМП». При нашкірному нанесенні у формі гелів троксерутин відносно повільно проникає крізь шкірний бар'єр, що забезпечує його тривалу циркуляцію у крові, лікарський засіб у значному ступені розподіляється та накопичується у тканинах. Гелі «Венозид» та «Троксевазин» є фармакокінетично еквівалентними препаратами місцевої дії. Фармакокінетика троксерутину залежить від лікарської форми та способу введення. Рівень концентрації троксерутину у крові при внутрішньошлунковому введенні у формі капсул на порядок вищий ніж при нашкірному нанесенні у формі гелю, що забезпечує

більш високу системну біодоступність троксерутину при пероральному застосуванні.

Summary

Orlova I.N.

Comparative experimental pharmacokinetic studies of troxerutin preparations

Pharmacokinetics of troxerutin dosage forms: («Troxerutin — KMP»), capsules, 300 mg; «Troxevasin», capsules, 300 mg; «Venozyd», gel, 2 %; «Troxevasin», gel, 2 %, in experiments in rabbits was studied. It was shown that after single intragastric administration of troxerutin in capsule form its gradual absorption to systemic bloodstream followed by well distribution in body tissues and elimination within 1 day takes place. «Troxevasin» capsules are characterized by more complete bioavailability in comparison with «Troxerutin-KMP» capsules. When applied cutaneously in the gel form, troxerutin relatively slowly penetrated through skin barrier that results in its long-term circulation in blood; the drug is distributed and accumulated substantially in tissues. The «Venozyd» and «Troxevasin» gels are pharmaceutically equivalent preparations with local action. Troxerutin pharmacokinetics depends on dosage form type and route of administration. Blood troxerutin level after intragastric administration is greater by an order than after cutaneous application in the gel form that provides higher systemic bioavailability of troxerutin when administered orally.

Орлова Ирина Николаевна. Окончила Харьковский государственный университет. Науч. сотр. лаборатории экспериментальной фармакокинетики, биоэквивалентности и токсикокинетики ГП ГНЦАС (с 1997).

Проблеми. Пошук. Рішення.

УДК 620.193.01:615.12.014

Севидова Е.К., Рой И.Д., Левитин Е.Я., Степанова И.И.

Национальный фармацевтический университет

Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»

Специфическая коррозия и методы защиты элементов фармацевтического оборудования

Приведены результаты исследования коррозии конструкционных материалов фармацевтического оборудования в условиях механического истирания их поверхности. Показано, что абразивно-коррозионный износ можно уменьшить с помощью алмазоподобных углеродных покрытий.

В химико-фармацевтическом производстве к технологическому оборудованию предъявляются особо высокие требования по коррозионной стойкости. Коррозионная стойкость конструкционных материалов должна, с одной стороны, обеспечить надежное функционирование оборудования в условиях контакта с химически агрессивными средами, с другой стороны — исключить попадание продуктов коррозии в производимые лекарственные препараты.

Требуемый уровень коррозионной стойкости достигается прежде всего за счет использования коррозионностойких металлов — титана и его сплавов, высоколегированных нержавеющей сталей, конструкционных неметаллических материалов — фарфоровых, стеклянных и эмалевых, в т.ч. на стальной основе.

В то же время существует проблема повышения износостойкости для ряда узлов и агрегатов, поверхность которых подвергается

одновременному механическому и химическому воздействию технологической среды. Такие процессы наблюдаются при таблетировании увлажненных масс [1]. В последнем случае изнашиваются материалы пуансонов и матриц. Возникающий при этом износ по своей сути является абразиво-коррозионным. Как было доказано ранее [2], такой тип износа, как правило, существенно превышает алгебраическую сумму чисто коррозионного и механического износов, поскольку оба вида воздействия интенсифицируют друг друга. Особенно эффективно это проявляется на металлах, высокая коррозионная стойкость которых обеспечивается наличием пассивных оксидных пленок. В условиях постоянной механической депассивации (удаление пленки) на поверхности происходит постоянное окисление металла или компонентов сплава с образованием продуктов коррозии. Кроме того, оксидные, гидроксидные, солевые поверхностные пленки, как правило, более мягкие и рыхлые, чем основной материал, и механически удаляются легче, что также способствует усиленному абразивному износу.

Аналогичные процессы характерны также для влажной грануляции (протирка массы лопастями через перфорированный цилиндр или сетку) и производства суспензий.

Традиционные для фармацевтического производства металлические конструкционные материалы — нержавеющие стали и титановые сплавы в приведенных условиях эксплуатации изнашиваются особенно интенсивно по описанному абразиво-коррозионному механизму.

Одним из успешных методов повышения коррозионной стойкости конструкционных материалов и инструментов во многих отраслях промышленности является модификация их поверхности путем нанесения функционально-защитных покрытий. Возможности метода существенно расширяются по мере развития высокоэнергетических способов получения покрытий, в том числе вакуумно-плазменных. Эти технологии позволяют получать пленки с уникальными физико-химическими и эксплуатационными характеристиками: высокой твердостью, износо- и коррозионной стойкостью, минимальными коэффициентами трения, электрохимической инертностью и др.

Целью настоящих исследований являлась оценка влияния защитных покрытий на коррозионную стойкость конструкционных ма-

териалов, используемых в фармацевтическом производстве, в условиях одновременного химического и абразивного (механического) воздействия на поверхность.

Объекты и методы исследований

В качестве представителей металлов использовали нержавеющую сталь 12Х18Н10Т и титановые сплавы ВТ5 и ВТ16. В качестве покрытий — алмазоподобное углеродное покрытие (АУП), нитрид титана (TiN) и твердый хром (Cr). АУП и TiN получали вакуумноплазменным электродуговым методом (КИБ), хром — гальваническим. Толщина всех типов покрытий — 2-3 мкм.

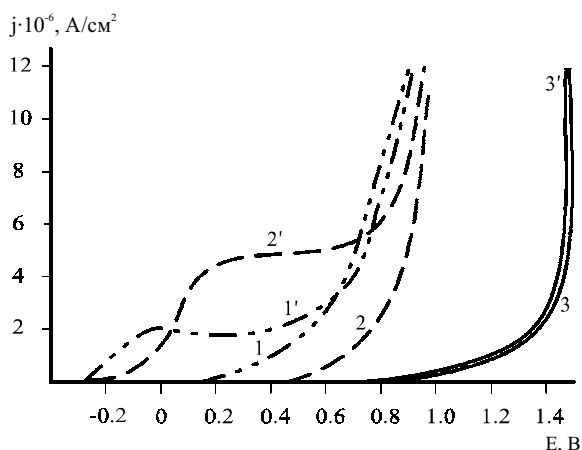
Коррозионную стойкость исходных материалов и систем с покрытиями оценивали с помощью электрохимических критериев — значений потенциалов коррозии $E_{кор}$ в пассивном (исходном) и активированном состоянии, характеристик анодных поляризационных зависимостей j - E (плотность тока — потенциал), и величины контактных токов короткозамкнутых гальванических элементов $i_{пасс./акт.}$ возникающих между пассивными и активированными участками металлических конструкций. Модельное активирование поверхности образцов осуществляли на лабораторной установке по методике [3]. Поляризационные исследования проводили по 3-х электродной схеме на потенциостате ПИ-50-1.1. Значения потенциалов приведены относительно хлоридсеребряного электрода. В качестве исследуемых коррозионных сред использовали насыщенные относительно компонентов таблеток водные растворы ацетилсалициловой кислоты (АСК) ($pH = 2.6$) и глюконата кальция (ГК) ($pH = 6.8$).

Результаты исследований и их обсуждение

Анализируя приведенные в таблице и на рисунках результаты исследований, можно отметить следующее.

В исходном, запассивированном состоянии термодинамическая стойкость к коррозионным поражениям у всех материалов (как с покрытием, так и без покрытия) достаточно высока. Относительно худшими показателями характеризуется нержавеющая сталь 12Х18Н10Т (Рис. 1, 2, кривая 1), которая начинает анодно активизироваться непосредственно от значений потенциала коррозии. Для всех остальных вариантов конструкционных материалов наблюдаются относительно продолжительные области пассивности (разность между значениями потенциалов акти-

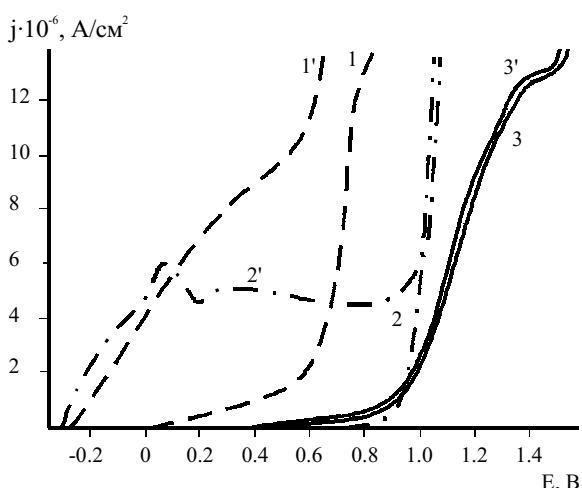
Рисунок 1



Анодные поляризационные кривые объектов исследования в растворе АСК

- 1, 1' — 12Х18Н10Т;
 2, 2' — ВТ5;
 3, 3' — АУП.
 (1', 2', 3' — после механической активации поверхности).

Рисунок 2



Анодные поляризационные кривые объектов исследования в растворе ГК

- 1, 1' — 12Х18Н10Т;
 2, 2' — ВТ5;
 3, 3' — АУП.
 (1', 2', 3' — после механической активации поверхности).

вазии и коррозии — участок поляризационной кривой, соответствующий нулевому значению тока), что дает основание считать их коррозионностойкими в обеих технологических средах.

Механическая депассивация поверхности, имитирующая трение твердыми частицами препаратов в процессах влажной грануляции или таблетирования, приводит к резкому раз-

благораживанию потенциалов коррозии как исходных конструкционных материалов, так и вариантов с покрытиями Cr и TiN (Табл.). Это свидетельствует о повышении их коррозионной активности, что подтверждается также анодными поляризационными кривыми (Рис. 1, 2, кривые 1', 2'), снятыми непосредственно после механической зачистки — область пассивности у них уменьшается до нуля.

Абсолютным преимуществом по отношению к приведенным материалам отличается алмазоподобное покрытие, электрохимическое поведение которого практически не зависит от абразивного воздействия на поверхность (Рис. 1, 2, кривые 3, 3'). Такая инертность поверхности АУП обеспечивается термодинамической стойкостью углеродной субстанции [4], а не существованием фазовых оксидных пленок, как в случае нержавеющей стали, титана, хрома и металлоподобного нитрида титана. TiN, хотя и относится к термодинамически стойким материалам, но из-за наличия в составе покрытия фазы α -титана, его электрохимическое поведение в большей или меньшей степени зависит от механической депассивации, что и наблюдалось в настоящих исследованиях.

Электрохимическая коррозия элементов фармацевтического оборудования может усиливаться не только за счет удаления пассивирующих слоев с металлических материалов, но и в результате действия короткозамкнутой гальванопары, возникающей между двумя участками конструкции с различной степенью запассивированности поверхности (Табл.). По этому показателю худший вариант (максимальный ток $i_{\text{пасс./акт.}}$) реализуется на нержавеющей стали, лучший — на нержавеющей стали с покрытием АУП. На обоих видах титановых сплавов, хотя и генерируются наибольшие по величине значения ЭДС ($E_{\text{корр. (пасс.)}} - E_{\text{корр. (акт.)}}$), величина возникающих токов сопоставима с токами гальванопар, защищенных покрытиями Cr и TiN, и меньше, чем у пары из 12Х18Н10Т. Данный эффект «несоответствия» можно объяснить высокой скоростью репассивации титановых сплавов, т.е. их способностью образовывать новые оксидные пленки на зачищенных (ювенильных) поверхностях. Согласно исследованиям [5, 6] монослой оксида на титане образуется уже в течение 0.1 ... 10 мс.

В общем случае скорость репассивации всех материалов в нейтральном растворе ГК выше, чем в кислом растворе АСК, в котором

Таблица

Электрохимические характеристики конструкционных материалов

Материал	Среда	E _{кор.} , В		i _{пас./акт.} , мкА	Скорость пассивации, мВ/с
		Пассивный	Активированный		
сталь 12X18H10T	АСК	+0.040	-0.26	35	5.2
	ГК	+0.065	-0.45	20	8.6
титановый сплав BT16	АСК	+0.115	-0.47	13	9.4
	ГК	-0.050	-0.70	10	10.2
титановый сплав BT5	АСК	+0.150	-0.47	17	5.8
	ГК	-0.125	-0.13	10	10.4
12X18H10T + TiN	АСК	+0.245	-0.12	15	2.8
	ГК	+0.140	-0.32	10	3.6
12X18H10T + Cr	АСК	+0.075	-0.43	10-15	8.2
	ГК	-0.050	-0.60	10	7.6
12X18H10T + АУП	АСК	+0.110	+0.125	0	-
	ГК	+0.090	+0.07	0	-

особенно интенсивно в условиях абразивного воздействия растворяется нержавеющей сталь.

Выводы

Установлено, что металлические детали фармацевтического оборудования, работающие в условиях абразиво-коррозионного износа целесообразно защищать с помощью алмазоподобных покрытий. Применение таких покрытий на истирающихся элементах оборудования позволит не только исключить коррозию, но и существенно уменьшить механический износ конструкционных материалов, поскольку твердость АУП примерно в 2 раза выше, чем у TiN, в 4-5 раз – чем у твердого хрома, в 15-20 раз превышает твердость титановых сплавов и нержавеющей стали [7]. Кроме того, учитывая низкие значения коэффициентов трения АУП в паре со многими материалами [8], можно ожидать положительный эффект от их использования не только при влажных, но и сухих процессах таблетирования или гранулирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Промислова технологія ліків: Підручник. У 2-х т. / В. І. Чуешов, М.Ю. Чернов, Л.М. Хохлова та ін. – Х.: Основа, Видавництво УкрФА, 1999. – Том 2. – 704 с.
2. Котляр А.М., Севидова Е.К., Стеглик Т.В. Исследование абразиво-коррозионного износа изделий с покрытиями TiN // Резание и инструмент. – Харьков, 1991. – Вып. 45. – С. 86-91.
3. Котляр А.М., Севидова Е.К., Стеглик Т.В. Об измерении токов коррозионных элементов конструкций при их механической депассивации // Физико-химическая механика материалов. – 1991. – № 1. – С. 103-105.
4. Тарасевич М.Р. Электрохимия углеродных материалов. – М.: Наука, 1984. – 253 с.
5. Калахан О.С. Кінетичні закономірності електрохімічних процесів корозійної втоми титанових сплавів //

Фізико-хімічна механіка матеріалів. – 2003. – № 5. – С. 14-26.

6. Фокин М.Н., Рускол Ю.С., Мосолов А.В. Титан и его сплавы в химической промышленности: Справочное пособие. - Л.: Химия. – 1978. – 200 с.
7. Севидова Е.К., Серова Н.Н., Пулань Л.И., Дюбнер Л. Оценка физико-механических характеристик алмазоподобных углеродных покрытий на биоинженерных материалах // Високі технології в машинобудуванні: Сб. наук. пр. НТУ „ХПІ”. - Харків: НТУ „ХПІ”. – 2001. – С. 244-249.
8. Габуля Г.Д., Островская Е.Л., Юхно Т.П. Триботехнические свойства материалов, предназначенных для работы в экстремальных условиях // Порошковая металлургия. – 2001. – № 3/4. – С. 47-57.

Резюме

Севидова О.К., Рой І.Д., Левітін Є.Я., Степанова І.І.

Специфічна корозія та методи захисту елементів фармацевтичного обладнання

Наведено результати дослідження корозії конструкційних матеріалів фармацевтичного обладнання в умовах механічного стирання їхньої поверхні. Показано, що абразиво-корозійний знос можна зменшити за допомогою алмазоподібних вуглецевих покриттів.

Summary

Sevidova Ye.K., Roy I.D., Levitin Ye.Ya., Stepanova I.I.

Specific corrosion and methods of protection of pharmaceutical equipment elements

The results of study of pharmaceutical equipment construction materials corrosion in the conditions of their surface mechanical galling are presented. It is shown that an abrasive-corrosive wear may be decreased by the diamond-like carbon coatings.

Севидова Елена Константиновна. Окончила факультет технологии неорганических веществ Харьковского политехнического института. К.т.н. (1990). Ст. науч. сотр. кафедры резания материалов и режущих инструментов НТУ «ХПИ».

Рой Ирина Дмитриевна. Окончила факультет технологии неорганических веществ Харьковского политехнического института. К.т.н. (1992). До-

цент кафедры физической, коллоидной и неорганической химии НФаУ.

Левитин Евгений Яковлевич. Окончил Харьковский фармацевтический институт. К.фарм.н. (1980). Доцент кафедры физической, коллоидной и неорганической химии НФаУ.

Степанова Ирина Игоревна. Окончила факультет технологии неорганических веществ Харьковского политехнического института. К.т.н. (1989). Доцент кафедры общей и неорганической химии НТУ «ХПИ».

Аналітичний огляд

УДК 615.457:616.211]:615.36

Сиденко Л.Н., Андрюкова Л.Н.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Органопрепараты в офтальмологии и ринологии: состояние и перспективы

Приведен обзор препаратов на основе субстанций животного происхождения, применяющихся в офтальмологии и ринологии, содержащих пептиды, мукополисахариды, нуклеотиды, нуклеозиды. Основная форма выпуска этих препаратов - инъекции. Показана целесообразность создания препаратов в форме глазных капель для стимуляции регионарного иммунитета.

В настоящее время актуальным является внедрение в медицинскую практику новых эффективных иммуностропных средств для лечения офтальмологических и ринологических заболеваний. Из иммуностропных препаратов физиологического (биологического) происхождения широкое распространение получили органопрепараты.

Важной задачей является поиск и разработка новых лекарственных средств, которые наряду с микрохирургическим воздействием позволяют осуществлять полноценную реабилитацию при заболеваниях глаз, а также заболеваниях полости носа и околоносовых пазух. Особое место в этой проблеме занимают лекарственные препараты на основе биорегуляторов.

Биорегулирующую терапию от традиционных методов лечения отличает ряд существенных достоинств, в том числе ее патогенетическая обоснованность. Применение лекарственных средств, созданных на основе пептидных биорегуляторов, способствует восстановлению и сохранению регуляторных механизмов межклеточного воздействия, что проявляется, в частности, восстановлением синтеза тканеспецифических белков [1].

Кроме того, в медицинской практике для профилактики и лечения заболеваний, в патогенезе которых большую роль играет уровень функционального состояния иммунной системы, находят применение мукополисахариды животного происхождения. Данные со-

единения, которые присутствуют в больших количествах в стекловидном теле и синовиальной жидкости, входят в состав основного внеклеточного вещества различных видов соединительной ткани [2]. Мукополисахариды обладают вязкоэластическими свойствами, поэтому они могут служить механическим защитным средством для тканей глаза во время хирургических операций и в послеоперационный период, не вызывают реакций на инородное тело или развития капсул соединительной ткани [3].

Целью данного сообщения явился анализ существующих современных органопрепаратов, используемых в офтальмологии и ринологии.

В офтальмологической и ринологической практике применяются препараты из таких органов и тканей животных:

- роговица, склера, стекловидное тело, сетчатка глаза;
- отдельные структуры головного мозга;
- ткани эмбриона;
- вилочковая железа (тимус);
- поджелудочная железа;
- мышечная ткань;
- кровь.

Препараты, полученные из роговицы, склеры, стекловидного тела, сетчатки глаз

Эта наиболее обширная группа представлена следующими препаратами: «Ретилин» (ретиаламин), «Колластоп», «Коллагеновое

покрытие пленочное», «Коллагеновый дренаж», «Керакол», «Куриозин», «Хеалон», «Глекумен», «Сбалансированный солевой раствор (ССР)».

«Ретилин» (МБЦ Санкт-Петербургского Института биорегуляции и геронтологии, Россия) - комплекс пептидов, выделенных из сетчатки глаз крупного рогатого скота. Он регулирует процессы метаболизма в сетчатке, стимулирует функции клеточных элементов, уменьшает деструктивные изменения в пигментном эпителии сетчатки, усиливает активность ретинальных макрофагов. Применяется в форме лиофилизированного порошка для приготовления раствора для инъекций при дистрофических заболеваниях сетчатки и хориоидеи, хориоретинитах любой этиологии, диабетической ретинопатии, пигментной периферической абiotрофии сетчатки. Многолетний опыт использования ретилина в офтальмологической практике позволяет утверждать, что регулярное применение препарата при различных заболеваниях сетчатки позволяет не только остановить патологический процесс, но и в 80 % случаев повысить зрительные функции. В 1999 году Ретинамин включен в Государственную Фармакопею РФ [4, 5].

В группу органотропных препаратов для офтальмологии входят также препараты на основе гиалуроновой кислоты, представляющей собой длинную цепь чередующихся остатков глюкокуроновой кислоты и N - ацетилглюкозамина, соединенных последовательно гликозидными связями. Впервые она была выделена Мейером и Палмером из стекловидного тела глаз крупного рогатого скота [6]. В офтальмологической практике гиалуроновую кислоту используют для лечения атрофии зрительного нерва, язв и ожогов роговицы, увеита, ирита, синдрома сухого глаза (ССГ) [7, 8]. Благодаря тому, что гиалуроновая кислота и муцин имеют подобные химические, структурные и реологические свойства, растворы гиалуроновой кислоты и ее солей могут быть использованы в качестве заменителей слез при таком заболевании глаза как синдром сухого глаза. Это и было установлено для препаратов гиалуроната натрия в концентрациях 0.1 – 0.2 % [9]. Для орошения глазного яблока или введения в переднюю камеру глаза при операциях катаракты разработаны составы растворов гиалуроновой кислоты [10]. В США запатентован эффективный способ ускорения заживления ран роговицы, основанный на использовании

длительно действующих вязкоэластичных водных или буферных растворов, содержащих в качестве активного ингредиента гиалуроновую кислоту или ее соль [11].

Препарат «Хеалон» («Фармация», Швеция) на основе гиалуроновой кислоты, выпускаемый в форме раствора для интраокулярных инъекций в одноразовых стерильных шприцах в комплекте с одноразовым стерильным катетером [12] является одним из лучших «вископротекторов» и используется в качестве «операционной среды», предохраняющей внутренние ткани глаз от механических повреждений.

Фирма «Гедеон Рихтер» производит 0.1 % раствор и 1 % гель «Куриозин». Гиалуроновая кислота и цинк - активные вещества препарата, обладают антисептическим действием, обеспечивают необходимые условия для заживления поврежденных тканей. Препарат применяется в комплексном лечении ожогов глаз и кожи век [13].

Препарат «Керакол» на основе гликозаминогликанов роговицы крупного рогатого скота разработан в Уфимском НИИ глазных болезней и выпускается УФ НПО «Иммунопрепарат». Он обеспечивает эффект просветления при ожогах, язвах, фистулах, десцеметозелле и механических травмах роговой оболочки. Препарат выпускается в виде порошка во флаконах и наносится на пораженную роговицу, при контакте с которой превращается в желеобразную массу [14]. Однако «Керакол», получаемый из роговицы глаз крупного рогатого скота путем специальной обработки и измельчения, обладает рядом недостатков: нерастворимостью в воде, быстрым смыванием слезой и необходимостью лечения пациентов в стационарных условиях. Это послужило основанием для разработки нового препарата - 1 % раствора глазных капель, в качестве основных действующих веществ которых являются гликозаминогликаны. Новый препарат превосходит «Керакол» по терапевтическому действию и не обладает его недостатками. Данный препарат ускоряет процесс репаративной регенерации, обеспечивает прозрачное заживление и улучшает анатомические исходы травмы, что свидетельствует об усилении репаративных свойств созданных глазных капель по сравнению с «Кераколом» [15].

«Глекумен» (МНТК «Микрохирургия глаза», Россия) - это комплекс гликозаминогликанов, который, в основном, активизирует пролиферацию эндотелия, а также кератоци-

тов стромы роговицы, оказывает противовоспалительное и противоречное действие. Применяется в форме инъекций под конъюнктиву при повреждении эндотелия или стромы роговицы, вызванных случайной или операционной травмой, может использоваться для фонофореза. Выпускается в ампулах или флаконах [16].

«Сбалансированный солевой раствор» (МНТК «Микрохирургия глаза», Россия) представляет собой стерильный раствор для использования при любых интраокулярных вмешательствах, требующих длительных перфузий, например, при операциях по экстракапсулярной экстракции катаракты, независимо от способа ее выполнения. Биологически активные вещества препарата - сульфатированные гликозаминогликаны. Клинические испытания, проведенные в клинике института «Микрохирургия глаза», показали высокую эффективность при различных оперативных вмешательствах. Препарат выпускается во флаконах по 250 мл и 450 мл.

В офтальмологической практике нашли применение лекарственные средства на основе коллагена склеры, которые, в основном, разработаны МНТК «Микрохирургия глаза». Это «Колластоп», «Коллагеновое покрытие пленочное», «Коллагеновый дренаж».

«Колластоп» (МНТК «Микрохирургия глаза», Россия) - стерильный препарат, изготовленный из гелеобразного сшитого коллагена склеры сельскохозяйственных животных, активизирует пролиферацию клеток соединительной ткани и способствует формированию соединительнотканной прослойки у наружной поверхности склеры, укрепляя ее и улучшая кровоснабжение. Все это обеспечивает стабилизирующий эффект при прогрессирующей миопии. Препарат выпускается в одноразовом шприце объемом 2.0 мл и 2.5 мл с пластмассовой изогнутой канюлей в специальной герметичной упаковке.

«Коллагеновое покрытие пленочное» (МНТК «Микрохирургия глаза», Россия) - пленка, повторяющая форму роговицы, изготовленная из коллагена склеры сельскохозяйственных животных. Данное покрытие ускоряет репаративные процессы в строме роговицы после повреждения роговой оболочки различной этиологии и способствует восстановлению светооптических свойств роговой оболочки глаза, обладает высокой биосовместимостью с тканями глаза. Применяется при лечении травм роговицы - операционных или случайных и заболеваний роговой оболочки глаза. Коллагеновое покрытие, которое ра-

сформировано через 4 - 6 час, накладывают на роговицу ежедневно в течение 2 - 5 сут. Покрытие выпускается в специальном контейнере по 1 шт. в стерильной, герметичной упаковке.

Находят применение в офтальмологии также имплантаты, представителем которых является «Коллагеновый дренаж» (МНТК «Микрохирургия глаза», Россия) - это микропористый имплантат, изготавливаемый из лиофилизированного коллагена склеры сельскохозяйственных животных. Препарат предназначен для улучшения оттока внутриглазной жидкости, предотвращения послеоперационного рубцевания вновь сформированных путей оттока при антиглаукоматозных операциях непроницающего типа. Коллагеновый дренаж обладает высокой биологической совместимостью с тканями глаза, что способствует активному течению послеоперационного периода. Положительный эффект операции с применением дренажа достигается не менее чем в 95 % случаев. Имплантат выпускается в сухом виде в стерильной, герметичной упаковке.

Препараты, полученные из отдельных структур головного мозга

К данной группе препаратов относятся «Кортексин» и «Эпиталамин».

«Кортексин» (МБЦ Санкт-Петербургского Института биорегуляции и геронтологии, Россия) - комплекс пептидов, выделенный из коры головного мозга крупного рогатого скота, адекватно воздействующий на волокна зрительного нерва и запускающий механизмы саморегуляции в нейронах сетчатки. Применяется в форме лиофилизированного порошка для внутримышечных инъекций при различных видах ретинопатий [17].

«Эпиталамин» (Санкт-Петербург, Россия) — комплекс пептидов, выделенный из эпителио-эпифизарной области мозга крупного рогатого скота. Препарат способствует восстановлению регуляторных механизмов, связывающих эндокринную и иммунную системы, является иммуномодулятором, поскольку регулирует синтез стероидов благодаря стимулирующему влиянию на кору надпочечников. Изучена возможность применения эпителио-эпифизарина в форме инъекций при лечении диабетической ретинопатии. Выпускается во флаконах по 1 мл [18, 17].

Препараты, полученные из тканей эмбриона

«Эрбисол» (Эрбис, Украина) - инъекционный раствор, представляющий собой комп-

лекс природных органических соединений эмбриональной ткани крупного рогатого скота. Препарат содержит пептиды, обладающие иммуномодулирующим, противовоспалительным, антидистрофичным и антиоксидантным действием. «Эрбисол» обладает иммуномодулирующим, противовоспалительным, антиоксидантным действием. По данным института глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова АМН Украины, проводившего клиническое изучение препарата, «Эрбисол» показал выраженный терапевтический эффект при лечении химических ожогов [19, 20], а также в комплексном лечении с «Антралем» при диабетической ретинопатии [21].

Препараты, полученные из вилочковой железы (тимуса)

К препаратам данной группы относятся «Вилозен», «Тималин», «Тимоген», «Тактивин».

На украинском рынке препараты для лечения заболеваний глаза и носа на основе вилочковой железы крупного рогатого скота представлены отечественным препаратом «Вилозен» (ЗАО «Биофарма», Украина), выпускаемым в ампулах в виде лиофилизированного порошка по 10 мкг для приготовления капель в нос со сроком применения после вскрытия упаковки 1 сут. Активные компоненты препарата: пептиды, нуклеозиды, нуклеотиды.

«Вилозен» - иммуномодулирующий препарат, который оказывает митогенное действие на Т-лимфоциты, стимулирует их пролиферацию и дифференцировку, подавляет образование реактивов, а также развитие гиперчувствительности замедленного типа [22]. Применяется интраназально для профилактики полиноза [23]. Также специалистами-офтальмологами апробирована возможность применения «Вилозена» в офтальмологии. Проводились исследования возможности применения данного препарата в комбинациях с различными лекарственными средствами. Например, применения «Вилозена» в комплексной терапии с «Антралем» при лечении больных с экссудативной реакцией после экстракции катаракты с имплантацией ИОЛ, с дистрофическими поражениями сетчатки на фоне хронических поражений печени, при диабетической ретинопатии [24, 25, 26]; комплексного применения «Вилозена» с «Пармидином» при диабетических поражениях сетчатки у больных с общими воспалительными осложнениями [27]; применения «Спленина» и «Ви-

лозена» в комплексной терапии больных простой диабетической ретинопатией [28]. В работе [29] представлены данные о местном применении «Вилозена» в виде пленок, приготовленных экстемпорально путем пропитывания гемостатической губки 1 % раствором и последующим погружением ее в конъюнктивальный мешок. Все эти исследования показывают положительный эффект применения «Вилозена» в офтальмологической практике.

«Тималин» («Белмедпрепараты», Белоруссия) - комплекс пептидов, выделенных из вилочковой железы крупного рогатого скота. Препарат восстанавливает нарушенную иммунологическую реактивность, стимулирует процессы регенерации и кроветворения в случае их угнетения, а также улучшает процессы клеточного метаболизма. С 1988 года данный препарат применяется для лечения офтальмогерпеса [30]. Выпускается во флаконах по 10 мг в виде лиофилизированного порошка для приготовления раствора для инъекций [31].

«Тимоген» («Белмедпрепараты», Белоруссия) - полипептид из вилочковой железы крупного рогатого скота. Выпускается в форме раствора для интраназального применения в тубик-капельнице по 1 мл. Является иммуностимулирующим препаратом системного действия, который усиливает неспецифическую резистентность организма. Применяется для профилактики осложнений при инфекционных заболеваниях, оперативных вмешательствах [32].

«Тактивин» (БИОМЕД им. И.И. Мечникова, Россия) - комплекс пептидов из вилочковой железы крупного рогатого скота. Нормализует количественные и функциональные показатели Т-системы иммунитета, стимулирует продукцию лимфокинов, α - и γ -интерферона, восстанавливает активность Т-киллеров, функциональную активность стволовых гемопоэтических клеток. Препарат выпускается в виде раствора для инъекций в ампулах по 1 мл, используется подкожно для лечения рецидивирующего офтальмогерпеса. Согласно литературным данным [33], Тактивин в виде подкожных инъекций показал высокие функциональные результаты лечения эндогенных увеитов.

Препараты, полученные из поджелудочной железы

Представителями данной группы препаратов являются «Химотрипсин» и «Коллагеназа».

«Химотрипсин» (ЗАО «Биофарма», Украина) - препарат в виде кристаллического порошка, выпускается в ампулах по 0.01 г для приготовления раствора. Содержит белок с относительной молекулярной массой 21600 - 27000. Применяется в офтальмологии и ринологии. В офтальмологии — при обширных тромбозах центральной вены сетчатки, острой непроходимости центральной артерии сетчатки, помутнениях стекловидного тела травматического и воспалительного происхождения, экстракции катаракты в форме подконъюнктивальных инъекций. В оториноларингологии - при гнойных синуситах, острых и подострых гнойных средних отитах в виде 0.1 % раствора, приготовленного на физиологическом растворе, который может храниться в течение 1 сут при температуре (2-5) °С [31].

«Коллагеназа» («Иммунопрепарат», Россия) получена из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Выпускается в ампулах в виде лиофилизированного порошка с содержанием коллагеназы 250 ЕД. Препарат предназначен для приготовления раствора для наружного применения и является протеолитическим ферментом с коллагенолитической, эластолитической, трипсиновой и химотрипсиновой активностью, способствует очищению ран, предупреждает развитие грубых рубцов, сохраняет эластичность кожи и мягких тканей. Применяют местно для лечения рубцовых изменений кожи век и конъюнктивы [34].

Препараты, полученные из мышечной ткани

К препаратам, выделенным из мышечной ткани высших животных и используемых в офтальмологии, относятся «Карнозин», 5 % глазные капли; «Ксено (гетеро-)» трансплантат.

Дипептид карнозин был открыт еще в начале XX века российскими учеными В.С. Гулевиным и А.В. Амираджиби [35]. Препарат впервые нашел применение в клинической практике в 30-е годы в виде инъекций при гипертонической болезни, язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, ревматоидном артрите, в стоматологии и только в 80-е годы — в офтальмологии. Создание стабильной глазной лекарственной формы стало возможным после разработки простой и экономичной технологии получения карнозина из мяса крупного рогатого скота [36]. Глазные капли разработаны Московским НИИ глазных бо-

лезней им. Гельмгольца и НИИ физико-химической медицины Минздрава РФ, где проведенные клинические испытания показали их эффективность в лечении заболеваний роговицы, трофических кератитов (в комбинации с йоддезоксисуридином), сухих кератоконъюнктивитов [37].

«Ксено (гетеро-)» трансплантат (МНТК «Микрохирургия глаза», Россия) предназначен для склероукрепляющих операций при прогрессирующей миопии различной степени у детей и взрослых. Препарат изготовлен из перикарда крупного рогатого скота, выпускается в форме пластинки в 70 % спирте во флаконах.

Препараты, полученные из крови

Данная группа включает «Солкосерил», 20 % гель глазной - депротеинизированный гемодиализат из крови телят; «Адгелон» - низкомолекулярный полипептид, полученный из супернатанта сыворотки крови животных.

Глазной гель «Солкосерил» («Solco Basel», Швейцария) содержит широкий спектр низкомолекулярных веществ, а именно, олигопептиды, нуклеозиды, нуклеотиды, аминокислоты, микроэлементы и предназначен для лечения язв и эрозии роговицы, механических, термических и химических повреждений глаз, воспалительных и дистрофических заболеваний роговицы и конъюнктивы, а также раздражения при ношении контактных линз [12].

«Адгелон» получен в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Участвуя в адгезионном процессе, препарат обеспечивает прикрепление, растяжение и миграцию различных типов клеток. В Московском НИИ глазных болезней им. Гельмгольца проведены исследования по изучению эффективности «Адгелона» (в концентрации 10^{-16} М раствора) при лечении необработанных проникающих ранений роговицы [38].

Выводы

1. Для лечения различных заболеваний глаз и носа предлагается широкий выбор препаратов на основе пептидов, нуклеотидов, нуклеозидов, мукополисахаридов животного происхождения, проявляющих высокую эффективность.

2. Приведенные в обзоре препараты в основном выпускаются в форме инъекций (водный раствор или лиофилизированный порошок) для внутримышечного или подкожного

применения. Препараты в форме капель на основе комплекса биологически активных веществ животного происхождения практически отсутствуют, что можно объяснить трудностью получения стабильных водных растворов с необходимым сроком хранения не только в герметичной упаковке, но и после ее вскрытия.

3. Целесообразность создания препаратов в форме капель на основе биологически активных веществ животного происхождения для применения в офтальмологии и ринологии заключается в том, что такая лекарственная форма оказывает влияние как на системный, так и на местный иммунитет. Применение препаратов в форме глазных/назальных капель дает возможность восстановить иммунологические показатели при хронических заболеваниях глаз и носа, а также при хронических соматических заболеваниях, вследствие которых возникают нарушения в этих органах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хавинсон В. X., Трофимова С.В. Случай успешного тринадцатилетнего применения пептидных биорегуляторов у пациентки с диабетической ретинопатией // Офтальмологический журнал. - 1999. - № 1. - С. 21-23.
 2. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимовой. – Москва: «Высшая школа», 1986. - С. 334.
 3. Brimacombe F.S., Webber F.M. Mucopolysaccharides. Chemical Structure, Distribution and Isolation. - Elsevier Publ. Co., 1964.
 4. Хавинсон В.Х., Трофимова С.В. Ретиналамин - тканеспецифический препарат сетчатки // Тези доповідей наукової конференції офтальмологів. - Одеса: АстроПринт, 2000. - С. 412-413.
 5. Даниличев В.Ф., Хавинсон В.Х., Васильева Л.А. Применение Ретилина (ретиналамина) для лечения периферической пигментной абiotрофии сетчатки // Там же. - С. 280-282.
 6. Meyerk K., Palmer J. // J. Biol. Chem. - 1934. - Vol. 107. - P. 629-634.
 7. Martindale. The extra pharmacopoeia / Ed. by J.E.F. Reynold, A.B. Prasad. – 28th ed. – London: Pharm. Press, 1982. - P. 1281.
 8. Kulkarni S., Bhanumathi B., Thoppi S., Bhoghe C., Vartak D., Amin P. Dry Eye Syndrom // Drug Dev. and Ind. Pharm. - 1997. – No. 5. - P. 465-471.
 9. Bothner H., Waaler T., Wik O. Rheological characterization of tear substitutes. // Drug Dev. and Ind. Pharm. - 1990. – No. 5. - P. 755-768.
 10. Радаева И.Ф., Костина Г.А. Использование гиалуроновой кислоты при различных патологических состояниях // Химико-фармацевтический журнал. - 1998. - № 9. - С. 38-40.
 11. Balazs E.A.. Modern Probl. Ophthalmol. – 1970. – Vol. 10, No. 3.
 12. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. - М.: ОВРЕЕ - АстраФармСервис, 2003. - 1408 с.
 13. «Куриозин» в комплексном лечении ожогов глаз и кожи век / Неделька А.Ф., Головкин В.А., Неделька В.И. и др. // Офтальмологический журнал. - 1999. - № 6. - С. 393 - 395.

14. Азнабаев М.Т., Суркова В.К., Даутова З.А. Эффективность нового биостимулятора - Керакола при травмах и болезнях роговицы // Человек и лекарство: Тез. докл. II Рос. нац. конгр. - Москва, 1995. - С. 278.
 15. Гликозаминогликаны роговицы крупного рогатого скота как потенциальное лекарственное средство для применения в офтальмологической практике / Сигаева Н.Н., Даутова З.А., Басченко И.А. и др. // Химико-фармацевтический журнал. - 1997. - № 6. - С. 40-43.
 16. Регистр лекарственных средств в России. - 2003. - 1438 с.
 17. Хавинсон В. X., Трофимова С.В. Влияние пептидных биорегуляторов на течении диабетической ретинопатии у пациентов на фоне туберкулеза легких // Офтальмологический журнал. - 1999. - № 5. - С. 283-286.
 18. Трофимова С.В., Хокканен В.М., Хавинсон В.Х. Предварительные результаты применения пептидных биорегуляторов у больных диабетической ретинопатией // Там же. - 1998. - № 5. - С. 393 - 398.
 19. Якименко С.А., Панько О.М. Застосування «Ербісолу» в лікуванні хімічних опіків очей // Там же. - 2003. - № 1. - С. 26-29.
 20. Метеліцина І.П., Панько О.М., Якименко С.А. та ін. Процеси перекисного окислення ліпідів і антиоксидантний потенціал крові й рогівки при хімічних опіках очей без і на тлі лікування ербісолом // Фармакологічний вісник. - 1999. - Січень-лютий. - С. 65-71.
 21. Петруня О.М. Клиническая эффективность антраля и эрбисола в комплексе лечения больных простой диабетической ретинопатией // Офтальмологический журнал. - 2001. - № 5. - С. 38-41.
 22. Гюллинг Э.В. О механизмах действия и способах применения иммуномодулятора вилозена: Инф. вып. - Киев: АН Украины, 1990. - 8 с.
 23. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. - Одесса.: АстроПринт, 1999. - 603 с.
 24. Логай И.М., Петруня О.М. Эффективность антраля и вилозена в комплексной терапии больных простой диабетической ретинопатией и их влияние на иммунологические показатели // Офтальмологический журнал. - 2001. - № 4. - С. 47-50.
 25. Трофимова С.В., Хавинсон В.Х., Хокканен В.М. Современные тенденции в лечении диабетической ретинопатии // Там же. - 1999. - № 5. - С. 339-346.
 26. Логай И.М., Петруня А.М. Эффективность новых украинских препаратов амизона и антраля при воспалительных и дистрофических заболеваниях органа зрения // Там же. - 2003. - № 1. - С. 53-57.
 27. Использование энтеросорбентов и дифференциальной иммунокоррекции в комплексной терапии больных диабетическими ретинопатиями / Петруня А.М., Гелуценко А.М., Зеленый И.И. и др. // Там же. - 1998. - № 3. - С. 195-198.
 28. Петруня О.М. Эффективность Спленина и Вилозена в комплексной терапии больных простой диабетической ретинопатией // Тези доповідей наукової конференції офтальмологів. - Одеса.: АстроПринт, 2000. - С. 226-227.
 29. Эффективность иммунокорректоров и энтеросорбентов в комплексной терапии диабетических ретинопатий у пациентов с общими воспалительными осложнениями / Соляник Ф.Т., Высоцкий А.А., Петруня А.М. и др. // Офтальмологический журнал. - 1997. - № 5. - С. 337-340.
 30. Способ лечения офтальмогерпеса: А.с. 1470290 СССР, МКИ⁴ А 61 К 37/02 / А.А. Каспаров, А.А. Войцеховская и др. - Заявлено 02.01.85; Опубл. 07.04.89.
 31. Компендиум. Лекарственные препараты / Под ред. проф. В.Н. Коваленко и проф. А.П. Викторова. - Киев: Морион, 2003. - 1388 с.

32. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. - М.: ОУПРЕЕ - АстраФармСервис, 1997. - 1504 с.
33. Пеньков М.А., Зубарев С.Ф., Аврущенко Н.М. и др. Сравнительная оценка клинической эффективности иммунокорректирующей терапии с использованием тимоптина, тактивина и декариса в лечении больных с эндогенными увеитами // Офтальмологический журнал. - 1993. - № 1. - С. 31-34.
34. Технология и стандартизация лекарств: В 2 т. - Харьков: РИРЕГ, 2000. - Т. 2. - С. 201-233.
35. Формазюк В.Е., Сергиенко В.И. Биохимия. - 1992. - Т. 57, № 9. - С. 1404-1416.
36. Способ получения карнозина из мяса крупного рогатого скота: А.с. 1624770 СССР / Лыскова О.Л., Дупин А.М., Болдырев А.А. и др.
37. Майчук Ю.Ф., Формазюк В.Е., Сергиенко В.И. Разработка глазных капель карнозина и оценка их эффективности при заболеваниях роговицы // Вестник офтальмологии. - 1997. - № 6. - С. 27-31.
38. Применение адгелона в лечении проникающих ранений роговицы в эксперименте / Гундоров Р.А., Ченцова Е.В., Ямска В.П. и др. // Там же. - № 2. - С. 12-15.

Резюме

Сиденко Л.М., Андриюкова Л.М.

Органопрепараты в офтальмології та ринології: стан і перспективи

Наведено огляд препаратів на основі субстанцій тваринного походження, що застосовуються в офтальмо-

логії та ринології, які містять пептиди, мукополісахариди, нуклеотиди, нуклеозиди. Основна форма випуску цих препаратів — ін'єкції. Показано доцільність створення препаратів у формі очних крапель для стимулювання регіонарного імунітету.

Summary

Sidenko L.N., Andriukova L.N.

Organodrugs in ophthalmology and rhinology: state and perspectives

The review of drugs on basis of substances of animal origin used in ophthalmology and rhinology and containing peptides, mucopolysaccharides, nucleotides and nucleosides is presented. The principal dosage forms of these drugs are injections. The expediency of creation of drugs in eye drops form for stimulation of regional immunity is shown.

Сиденко Лариса Николаевна. Закончила УкрФА (1998). Мл. науч. сотр. лаборатории глазных, ушных и назальных лекарственных форм ГП ГНЦЛС.

Андриюкова Лариса Николаевна. Окончила Харьковский политехнический институт. Работает в ГП ГНЦЛС (с 1982). К.фарм.н. (1994). Зав. лабораторией глазных, ушных и назальных лекарственных форм (ЛУНЛФ).

Техніко-економічні та маркетингові дослідження

УДК 338.5:615.2/3

Пивень Е.П.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Научно-практические подходы к оценке стоимости научно-технической продукции при подготовке договора на создание лекарственного средства и продаже лицензии

Разработана модель формирования компромиссной цены на фармацевтическую научно-техническую продукцию (НТП), которая отражает две концепции ценообразования: возмещение затрат на создание НТП (затратный подход) и учет экономических выгод от ее использования (доходный подход). Разработана методика установления компромиссной цены на фармацевтическую НТП, которая позволяет установить ее стоимость как на стадии заключения договора на создание лекарственного средства (ЛС), так и на этапе продажи лицензии на готовую разработку. Предложено ставку роялти устанавливать в соответствии с разработанной классификационной системой с учетом категории ЛС, которая зависит от уровня его инновации и терапевтической эффективности.

В современных условиях формирования рыночных отношений во всех сферах деятельности, в том числе и научной, особую актуальность приобретает обоснованная оценка стоимости научно-технических разработок по созданию ЛС, что позволит создать благоприятные условия для эффективного развития фармацевтической науки и производства.

Важность решения данной проблемы объясняется сложностью вопросов ценообразования при коммерциализации интеллек-

туальной собственности (ИС), которая находит отражение в научно-технической продукции (НТП), и различными подходами специалистов к методам определения рыночной стоимости НТП.

Как показывает мировой опыт, для оценки стоимости НТП (в том числе объектов интеллектуальной собственности), как правило, используются следующие подходы: затратный, рыночный, доходный [3, 7, 8].

В основе затратного подхода лежит учет стоимости фактических затрат на создание,

правовую охрану, маркетинговую проработку, приобретение и использование оцениваемой НТП за прошедший период с учетом инфляции и всех потерь. Однако данный подход к ценообразованию на НТП не отражает фактические экономические выгоды, получаемые производителем от использования данной продукции, в т.ч. интеллектуальной собственности.

При рыночном подходе используется метод прямого сравнения продаж, который предполагает определение стоимости НТП по цене сделок купли-продажи аналогичных объектов с учетом поправок на их различие. Данный метод основан на принципе эффективно функционирующего рынка НТП, на котором инвесторы покупают и продают аналогичного типа продукцию, принимая при этом независимые индивидуальные решения. Данные по аналогичным сделкам сравниваются с оцениваемой НТП. Однако этот метод в настоящее время в Украине находит ограниченное применение в силу несформированности рыночных отношений на НТП, уникальности и специфики самих объектов интеллектуальной собственности (ОИС) при создании ЛС, разнообразия условий коммерческих сделок и конфиденциальности сведений по ним. Так, для принципиально нового лекарственного препарата практически невозможно найти полный аналог для проведения сравнительной оценки. Поэтому определение цен на научно-техническую продукцию по созданию ЛС, защищенных охраняемыми документами, на основе сложившейся конъюнктуры на рынке (спроса и предложения на НТП) не рассматривается участниками инновационного процесса как справедливое. При таком подходе также отсутствует взаимосвязь цен на НТП с фактически получаемыми производителями ЛС экономическими выгодами от использования ОИС.

Наиболее широкое распространение в мировой практике получил доходный подход к оценке стоимости НТП, который строится на расчете экономических выгод, ожидаемых от ее использования. При этом стоимость НТП определяется как ее способность приносить доход в будущем лицензиату и приравнивается к текущей стоимости чистого дохода, который может быть получен от ее использования за экономически обоснованный срок службы [6].

Доходный подход при оценке НТП может быть реализован с помощью метода дисконтирования будущих ежегодных денежных

доходов или поступлений роялти и метода капитализации доходов или роялти.

Для каждого из этих подходов характерны свои методы оценки, учитывающие основные факторы и отраслевые особенности, влияющие на уровень стоимости НТП. Выбор метода стоимостной оценки НТП (в т.ч. ОИС) зависит от типа определяемой стоимости (стоимость исключительных и неисключительных прав, передаваемых на основе лицензионного договора об их уступке, стоимость действующего предприятия, стоимость вносимых в качестве уставного капитала ОИС, стоимость в условиях ограниченного рынка и др.), целей проведения стоимостной оценки и от того, как планируется использовать ее результаты [11].

В зарубежной практике для оценки стоимости лицензий находят широкое применение комплексные подходы, что позволяет установить компромиссную цену на объект лицензионного договора [8, 2, 5, 6]. Автор так же придерживается мнения о необходимости использования комплексных подходов при оценке стоимости НТП.

В отношениях между разработчиком и производителем ЛС постоянно возникает необходимость оценки стоимости НТП на стадии подготовки договора на разработку лекарственного препарата, а также на этапе подготовки лицензионного договора на созданную продукцию.

Целью данной работы является разработка научно-практических подходов к оценке стоимости фармацевтической НТП для заключения хозяйственных и лицензионных договоров на основе компромиссной цены.

Сущность предлагаемого подхода заключается в том, что в рыночных условиях в основу методологии оценки стоимости фармацевтической НТП должен быть положен комплексный подход, учитывающий две разные концепции ценообразования: возмещение затрат на создание научно-технической продукции (затратный подход) и учет экономических выгод от ее использования, в т.ч. объектов интеллектуальной собственности (доходный подход). Так как потребительная стоимость НТП заключается в ее способности обеспечивать получение производителем экономических выгод (прибыли), то и установление цены на ее основе относится к ценностным подходам ценообразования.

При затратном подходе цена на НТП формируется на основе сметы затрат и нормативного уровня прибыли. Затратный подход к

ценообразованию целесообразно использовать для определения минимальной цены НТП, ниже которой сделка становится невыгодной для разработчика (нижняя граница цены). Такая цена является отправной в процессе переговоров относительно уровня стоимости НТП. Цена, установленная на основе доходного (ценностного) подхода, рассматривается в качестве максимальной (верхняя граница цены). Окончательная стоимость фармацевтической НТП находится в области между этими двумя границами и представляет собой компромиссную цену, которая определяется в процессе переговоров двух сторон.

Фактически компромиссная цена является ценой уравнивания (гармонизации) разнонаправленных целей разработчика НТП и производителя ЛС, которые выражаются в стремлении производителя назначить минимально возможную цену (нижняя граница цены), а разработчика — максимально возможную (верхняя граница цены).

Модель формирования компромиссной цены на фармацевтическую НТП представлена на Рисунке.

Принятие решения об уровне компромиссной цены на НТП непосредственно зависит от ряда факторов, на нее влияющих. Такими факторами, которые необходимо учитывать при оценке стоимости фармацевтической научно-технической продукции при подготовке лицензионного договора являются:

— ценность ОИС, обеспечивающая получение дополнительной прибыли от его использования по сравнению с препаратами-аналогами;

— размер капиталовложений, необходимых для организации производства и продвижения на рынок ЛС, выпуск которого будет осуществляться на основе оцениваемой НТП;

— емкость рынка и конкурентоспособность ЛС, производство которого будет осуществляться на основе НТП;

— расходы разработчика на создание НТП, проведение маркетинговых исследований;

— величина ожидаемых экономических выгод от производства ЛС на основе НТП;

— исключительная или неисключительная лицензия на производство ЛС на основе ОИС;

— риски получения экономических выгод от производства ЛС на основе НТП;

— вид платежа за лицензию на производство ЛС и др.

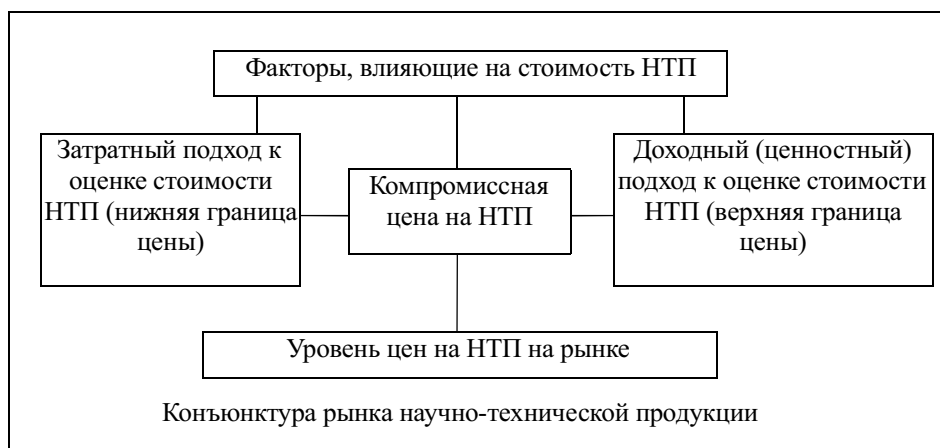
В соответствии с разработанной нами методикой для установления компромиссной цены на фармацевтическую НТП необходимо оценить верхнюю и нижнюю (максимальную и минимальную) ее границы.

Определение минимальной границы цены на фармацевтическую НТП. Затратный подход

Затратный подход к определению минимальной стоимости фармацевтической НТП заключается в оценке всех затрат на создание ЛС.

Учитывая венчурность спроса на фармацевтическую НТП, сложившегося в Украине, при оценке минимальной границы цены на НТП, рассчитанной на основе метода первоначальных затрат, целесообразно учитывать все затраты, связанные с разработкой ЛС,

Рисунок



Модель формирования компромиссной цены на фармацевтическую НТП

обеспечением его правовой охраны и маркетинговой проработкой рынка сбыта.

Эти затраты корректируются на коэффициент приведения разновременных стоимостных оценок на момент оценки стоимости НТП. При использовании метода обновленной стоимости определяется сумма затрат, необходимых для воспроизводства НТП на текущий момент времени.

Определяющей позицией для расчета цены на НТП при заключении договора на создание ЛС при использовании затратного подхода является оценка трудоемкости выполняемых НИР. Учитывая наличие элемента неопределенности трудоемкости разработки НТП, не представляется возможным при планировании НИР устанавливать точные затраты времени на решение поставленных задач.

Проведение работ по определению трудоемкости создания НТП ставит перед необходимостью выбора наиболее приемлемых методов. Все многообразие существующих способов оценки трудоемкости создания НТП можно свести к трем основным методам: экспертный, опытно-статистический и расчетно-аналитический. При определении цены на НТП оценку трудозатрат, необходимых для разработки ЛС (как генерика, так и принципиально нового), целесообразно осуществлять на основе экспертных оценок и опытно-статистических данных. Для оценки затрат на фармацевтическую НТП методом экспертных оценок предпочтительно использовать методику, основанную на стохастических законах распределения трудоемкости выполнения работ. Так, в основу расчетов может быть положено β -распределение трудоемкости выполнения работ, которое отражает тот факт, что превышение трудовых затрат по сравнению с плановым уровнем может встречаться значительно чаще, чем уменьшение [10].

При заключении лицензионного договора в большинстве случаев при расчете нижней границы цены НТП возникает необходимость оценки прошедших затрат разработчика на дату завершения договора по созданию ЛС или на дату оценки. Для этого необходимо учитывать фактор времени путем приведения разновременных стоимостных оценок в течение расчетного периода. Поэтому, если продолжительность разработки ЛС превышает год до окончания расчетного периода (в случае принципиально нового лекарственного средства (ПНЛС)) или если разработка ЛС

была закончена более чем за один год до момента оценки, минимальная граница цены НТП рассчитывается по формуле:

$$C_{\min} = \sum_{t=t_n}^{t_k} Z_t \cdot a_t \quad (1)$$

где:

Z_t — суммарные затраты на создание, обеспечение правовой охраны, проведение маркетинговых исследований на оцениваемую НТП в t -м году расчетного периода;

t_n — начальный год расчетного периода (начальный год разработки НТП);

t_k — конечный год расчетного периода (год расчета стоимости НТП);

a_t — коэффициент приведения разновременных стоимостных оценок в течение расчетного периода. Учитывает изменение стоимости денег во времени и инфляции за период с момента осуществления затрат до момента оценки.

Если разработка препарата-генерика была закончена на момент оценки, с учетом того, что продолжительность разработки воспроизведенного ЛС длится менее одного года, коэффициентом приведения разновременных стоимостных оценок можно пренебречь.

Определение максимальной границы цены на фармацевтическую НТП. Доходный подход

Расчет верхней границы цены НТП основан на оценке экономических выгод от ее использования за весь срок полезного ее применения. В этом случае определяется доля экономических выгод, на которую может рассчитывать разработчик НТП при условии продажи лицензии. При этом разработчик оценивает стоимость лицензии в размере дохода, который оказался бы не ниже, чем при альтернативных нормах реализации объекта соглашения.

Исходя из международного опыта продажи лицензий, оценку стоимости фармацевтической НТП, в том числе ОИС, целесообразно проводить на основе периодических отчетов в виде фиксированных ставок от объема реализуемой по лицензионному договору продукции (роялти), установленных в виде процента от запланированных объемов реализации лекарственного препарата по лицензии, по следующим формулам:

$$C_{II \max} = \sum_{t=1}^T P_t \cdot V_t \cdot R_t ; \quad (2)$$

$$C_{E \max} = \sum_{t=1}^T P_t \cdot V_t \cdot R_t \cdot K_t, \quad (3)$$

где:

$C_{П \max}$ — максимальная цена на НТП при периодических отчислениях (суммарная стоимость периодических денежных потоков роялти);

$C_{E \max}$ — максимальная единоразовая цена НТП (суммарная текущая стоимость денежных потоков роялти, приведенных на момент оценки);

P_t — цена ЛС за единицу в t -м году;

V_t — объем реализации ЛС в t -м году;

R_t — ставка роялти в t -м году;

K_t — коэффициент дисконтирования в t -м году;

T — период полезного использования ОИС.

Верхнюю границу цены целесообразно рассчитывать не только в случае лицензионного договора, но и при заключении договора на разработку ЛС. В этом случае в договоре, наряду с фиксированной оплатой за разработку, указываются отчисления в виде роялти.

Для оценки объема выпуска и уровня конкурентоспособной цены на ЛС проводятся комплексные маркетинговые исследования рынка, где предполагается его реализация в соответствии с договором.

В международной торговле лицензиями величину роялти обычно определяют на основании среднестатистических данных, сложившихся в мировой практике для разных отраслей промышленности (для фармацевтической — 2-7 %) [3].

При установлении ставки роялти на НТП необходимо учитывать категорию ЛС, которая зависит от степени его инновации и уровня терапевтической эффективности. В соответствии с предложенной нами классификационной системой лекарственных средства распределяются по категориям [11]:

— принципиально новые лекарственные средства (ПНЛС) на основе нового биологически активного соединения;

— усовершенствованные лекарственные средства (УЛС);

— лекарственные препараты-генерики, традиционные препараты.

К ПНЛС относятся:

— препараты, которые представляют собой новую группу ЛС для лечения патологий;

— препараты нового поколения, которые обладают похожим, но более сильным терапевтическим эффектом.

К УЛС относятся:

— комбинированные препараты, которые изготовлены на основе известных субстанций, в результате чего усиливается их терапевтическая эффективность;

— лекарственные формы, которые улучшают фармакокинетические свойства субстанций (новые лекарственные формы на основе известных субстанций, пролонгированные лекарственные формы и др.).

К препаратам-генерикам относятся воспроизведенные препараты, которые имеют одинаковое международное непатентованное наименование субстанции, которая вышла из-под патентной защиты.

К традиционным препаратам относятся ЛС, которые традиционно (продолжительное время) используются в медицинской практике.

Наиболее высокий уровень ставок роялти должен устанавливаться на ПНЛС на основе новых биологически активных соединений, для которых потенциально имеет место формирование наиболее полного пакета охраняемых документов: на БАС, состав лекарственного средства, способ получения, применение по новому назначению, способ лечения, методы анализа, устройства, товарный знак, промышленный образец [4].

Ставка роялти по договору на ЛС может быть рассчитана по формуле [8]:

$$P = \frac{R \cdot D}{1 + R} \cdot 100, \quad (4)$$

где:

R — рентабельность (к себестоимости) производства ЛС;

D — доля прибыли разработчика в общем объеме прибыли от производства и реализации ЛС в соответствии с разработанной НТП.

Для расчета ставки роялти также может быть использована рентабельность предприятия в целом или среднеотраслевая рентабельность.

Как показывает международный опыт, отсутствие патентной защиты, как правило, понижает размер роялти на 10-30 % по сравнению с аналогичной НТП, которая защищена охраняемыми документами (патентом).

Таким образом, компромиссная цена на фармацевтическую НТП будет находиться между граничными ее значениями, рассчитанными на основании затратного и доходного подходов в соответствии с предложенной

методикой. Компромиссная цена является договорной и согласовывается сторонами.

При установлении цены на НТП, которая определяется на базе роялти, как правило, учитывается положение о выплате производителем определенной фиксированной суммы (первоначального платежа) на начальном этапе реализации лицензии. Наличие условия о выплате первоначального платежа должно учитываться в сторону уменьшения при определении размера роялти, подлежащего выплате производителем по лицензионному договору.

Если разработка ЛС осуществлялась на средства разработчика или бюджетные средства, скорректированная величина роялти при первоначальном платеже рассчитывается по формуле:

$$P_{СК} = [P \cdot (1 - \Pi_{ye})] \cdot 100, \quad (5)$$

где:

- $P_{СК}$ — размер роялти, скорректированный на величину первоначального платежа;
- P — размер роялти для установленной компромиссной цены на НТП;
- Π_{ye} — удельное значение первоначального платежа в общей единовременной компромиссной цене НТП ($\Pi_{ye} = 0.1 \div 0.3$).

Величина первоначального приведенного платежа рассчитывается по формуле:

$$\Pi = \Pi_{ye} \cdot Ц_{ке}, \quad (6)$$

где:

- Π — величина первоначального приведенного платежа на момент оценки;
- $Ц_{ке}$ — компромиссная единовременная стоимость (цена) НТП, приведенная на момент проведения оценки.

Если разработка ЛС осуществлялась на средства производителя, величина этих средств при заключении лицензионного договора может рассматриваться в качестве первоначального платежа (или его части). С учетом величины первоначального платежа скорректированный размер роялти может быть определен по следующей формуле:

$$P_{СК} = \left[P \cdot \left(1 - \frac{Ц_{пе}}{Ц_{ке}} \right) \right] \cdot 100, \quad (7)$$

где:

- $Ц_{пе}$ — величина средств, оплаченная производителем за разработку ЛС и приведенная на момент оценки.

Для ограничения зависимости платежей, получаемых разработчиком, от уровня освоения производителем фармацевтической НТП в лицензионном договоре должны найти отражение, помимо первоначального платежа, также дополнительные гарантированные платежи. В таком случае для разработчика будет гарантировано получение фиксированных платежей, независимо от степени освоения производителем НТП. Расчет может быть проведен по формуле:

$$P_{МГ} = [P \cdot (D_p - \Pi_{ye})] \cdot 100 \quad (8)$$

где:

- $P_{МГ}$ — минимально гарантированный размер роялти, определяющий фиксированные платежи, независимо от степени освоения НТП;
- D_p — фиксированная доля обязательных отчислений от уровня роялти, согласованная сторонами при подписании договора.

В соответствии с разработанной методикой оценки стоимости НТП рассчитана компромиссная цена исключительной лицензии на использование изобретения "Лекарственное средство для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы" по патенту Украины (начало действия патента - 1997 год). Объектом интеллектуальной собственности для данного ЛС является изобретение (состав ЛС) и знак для товаров и услуг, которые защищены охранными документами до 2017 года.

В соответствии с предложенной классификационной системой, основанной на уровне инновации НТП, препарат может быть отнесен к категории усовершенствованных (комбинированных) ЛС, для которых ставка роялти может быть определена на уровне 5%.

Оценка стоимости лицензии проведена на 2003 год для условий использования НТП в течение 10 лет. Уровень приведенных к 2003 году инвестиций разработчика на создание ЛС составил 117 тыс грн. Соответственно, уровень приведенных инвестиций производителя составил 139 тыс грн. Если НТП будет использоваться в течение 10 лет, то при объеме реализации ЛС на сумму 3.7 млн грн в год и уровне роялти 5% максимальная единовременная цена составит 1 млн грн. Тогда компромиссная цена на НТП будет находиться между нижней границей, рассчитанной на основе затратного подхода (117 тыс грн) и максимальной единовременной ценой, рассчитанной на основе доходного подхода (1 млн грн).

Если стороны (разработчик и производитель) придут к соглашению, что компромиссная цена должна соответствовать приведенной единовременной стоимости при роялти 3 %, она составит 625 тыс грн.

Если инвестиции производителя в создание ЛС (139 тыс грн) будут рассматриваться в качестве первоначального платежа, предстоящий единовременный размер выплат составит 486 тыс грн.

В этом случае скорректированный размер роялти, в соответствии с которым должны осуществляться выплаты (от объема реализованной продукции), составит 2.3 %. Минимально гарантированный размер роялти для обеспечения гарантированных платежей независимо от степени освоения производителем НТП, если имеется соответствующая договоренность между сторонами, составит 0.84 %.

Выводы

1. Оценку стоимости НТП (в т.ч. прав на ОИС) при разработке ЛС и продаже лицензии целесообразно осуществлять на основе комплексного подхода, предусматривающего установление компромиссной цены между граничными ее уровнями, рассчитанными на основе затратного и доходного методов ценообразования.

2. Разработанная методика расчета цены на фармацевтическую НТП позволяет определить ее стоимость как на стадии заключения договора на разработку ЛС, так и на этапе продажи лицензии на разработанный препарат.

3. При установлении ставки роялти целесообразно учитывать категорию ЛС, зависящую от уровня его инновации и терапевтической эффективности, в соответствии с разработанной классификационной системой.

4. Установление компромиссной цены на фармацевтическую НТП способствует гармонизации разнонаправленных целей разработчика и производителя ЛС, что позволяет создать благоприятные условия для эффективного развития научной и производственной базы в фармацевтической отрасли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Визначення прибутку від використання об'єктів промислової власності. Методичні рекомендації / Держпатент України. — Київ: УкрІНТЕІ, 1997. — 25 с.
2. Дахно И.И. Патентоведение. — Харьков: Ксилон, 1997. — 313 с.
3. Десмонд Р.М., Келли Р.З. Руководство по оценке бизнеса: Пер. с англ. / Под ред. И.Л. Артеменкова. — М., 1988. — 272 с.
4. Защита прав интеллектуальной собственности в области создания лекарственных средств / Георгиевский В.П., Дихтярёв С.И., Маслова Н.Ф., Пивень Е.П., Стан-

дара В.М. // Фармаком. - 2002. — № 2. — С. 67-70.

5. Зінов В.Г., Гугель В.Л., Лопатина В.В. Вартісна оцінка інтелектуальної власності у сфері матеріального виробництва // Інформація і ринок. - 1992. — № 4. — С. 73-77.

6. Золотых Н. Ценообразование в практике международного обмена // Интеллектуальная собственность. - 1996. - № 1-2. — С. 8-15.

7. Леонтьев Б. Російський досвід оцінки об'єктів інтелектуальної власності // Інтеллектуальна власність. - 1999. - № 2. — С. 24-28.

8. Новосельцев О. Методи розрахунку ціни ліцензії // Там же. - № 3-4. — С. 53-60.

9. Пивень Е.П. Разработка научных подходов к оценке конкурентоспособности лекарственных средств на основе потребительской стоимости и фармакоэкономических принципов // Фармаком. - 2003. — № 4. — С. 50-57.

10. Разработка трудовых нормативов на проведение НИР по созданию лекарственных средств / Пивень Е.П., Рассоха Т.Н., Спиридонова Э.С. и др. // Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств: Материалы межресп. конф. — М., 1991. — Т. 1. — С. 41-43.

11. Стандарт российского общества оценщиков. Оценка объектов интеллектуальной собственности // Вестник оценки. - 1996. — № 5-6. — С. 9-11.

Резюме

Пивень О.П.

Науково-практичні підходи до оцінки вартості науково-технічної продукції при підготовці договору на створення лікарського засобу та продажу ліцензії

Розроблено модель формування компромісної ціни на фармацевтичну науково-технічну продукцію (НТП), що відбиває дві концепції ціноутворення: відшкодування витрат на створення НТП (витратний підхід) і врахування економічних вигід від її використання (дохідний підхід). Розроблена методика встановлення компромісної ціни на фармацевтичну НТП, яка дозволяє встановити її вартість як на стадії укладання договору на створення ЛЗ, так і на етапі продажу ліцензії на готову розробку. Запропоновано ставку роялті встановлювати відповідно до розробленої класифікаційної системи з урахуванням категорії лікарського засобу (ЛЗ), що залежить від рівня його інновації та терапевтичної ефективності.

Summary

Piven E.P.

Scientific and practical approaches to assessment of scientific and technical production value in preparation of agreement on medicinal agent creation and license sale

A model of forming of compromise price on pharmaceutical scientific and technical production (STP), being representative of two pricing concepts: STP development cost reimbursement (cost-is-no-object approach) and its use economic benefits accounting (income approach). The procedure of establishing of pharmaceutical STP compromise price, which allows its cost to be ascertained both at the stage of making an agreement of medicinal agent (MA) creation and at the stage of a licence for finished development work sale. It was proposed to establish a royalty rate according to the developed classification system with regard to the MA category, which depends on its innovation level and therapeutic efficacy.

Пивень Елена Петровна. Окончила Харьковский инженерно-экономический институт (1977). Работает в ГП ГНЦЛС. Зав. лабораторией маркетинговых и технико-экономических исследований (1999). К.фарм.н. (1988).