

## Зміст

**До 85-річчя заснування Державного підприємства  
«Державний науковий центр лікарських засобів»***Георгієвський В.П.*

У постійному прагненні до прогресу (Внесок ДП ДНЦЛЗ у розвиток фармацевтичної науки та промисловості. Історичний аспект) ..... 4

**До запровадження Державної Фармакопеї України***Гриздуб О.І., Леонтьєв Д.А., Архіпова Н.М.,**Зволінська Н.М., Овчинникова Т.І., Денисенко Н.В.*

Атестація тестових зразків розчину глюкози 5 % для інфузій для кількісного визначення глюкози методом рефрактометрії ..... 28

**До видання Доповнення 2 до Державної Фармакопеї України***Доля В.Г., Товмасьян Є.К., Гриздуб О.І., Георгієвський В.П.*

Контроль невидимих механічних включень у лікарських засобах для парентерального застосування: зміни до статті Державної Фармакопеї України ..... 39

Проект статті «Механічні включення: невидимі частки» ..... 43

*Котов А.Г., Котова Е.Е., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.*

Питання введення у Державну Фармакопею України монографії «Бузини квітки» ..... 47

Проект монографії «Бузини квітки» ..... 52

*Котов А.Г., Котова Е.Е., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.*

Питання введення у Державну Фармакопею України монографії «Липи квітки» ..... 54

Проект монографії «Липи квітки» ..... 60

**Фітохімічні дослідження***Литвиненко В.І., Попова Н.В., Павлова І.О.*

Дослідження бергеніну в рослинах роду бадан ..... 62

*Бовтенко В.О., Рибаченко А.І., Литвиненко В.І., Попова Т.П., Бобкова Л.Н.*

Стандартизація флавоноїдного складу водно-спиртових екстрактів листя м'яти перцевої ..... 67

*Керимов Ю.Б., Ісаєв Д.І., Деркач А.І.*Одержання та вивчення есцину з оплодня *Aesculus hippocastanum* L. .... 71**Синтез та вивчення фармакологічної дії***Нікітін В.О., Коваленко С.І., Беленічев І.Ф.*

Синтез деяких похідних 2-метил-4(3Н)-хіназолону, їх фізико-хімічні та біологічні властивості ..... 74

**Фармакологічні дослідження***Орлова І.М.*

Вивчення фармакокінетики гіфларину — ін'єкційного препарату гіпоазотемічної дії ..... 81

**Аналітичний огляд***Січкара Л.А., Діхтярьов С.І.*

Способи виділення та очищення природних інгібіторів протеолітичних ферментів ..... 84

До відома авторів журналу «Фармаком» ..... 88

- 
- Заст. головного редактора д.фарм.н., професор Спиридонов В.М.
  - Рецензенти: д.х.н., професор Гриздуб О.І., к.фарм.н. Котов А.Г., д.х.н., професор Литвиненко В.І., д.б.н., професор Маслова Н.Ф., к.х.н. Рибаченко А.І.
  - Випуск підготували: Саматов Р.С., Тихоненко Т.М., Тихоненко Н.І.
  - Рекомендовано до друку Вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів», протокол № 1 від 18.03.2005 р.
  - Підписано до друку 29.03.2005 р. Тираж 500 прим.
-

## Содержание

### **К 85-летию основания Государственного предприятия**

#### **«Государственный научный центр лекарственных средств»**

*Георгиевский В.П.*

В постоянном стремлении к прогрессу (Вклад ГП ГНЦЛС в развитие фармацевтической науки и промышленности. Исторический аспект) ..... 4

### **К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины**

*Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Архипова Н.Н.,  
Зволинская Н.Н., Овчинникова Т.И., Денисенко Н.В.*

Аттестация тестовых образцов раствора глюкозы 5 % для инфузий для количественного определения глюкозы методом рефрактометрии ..... 28

### **К изданию Дополнения 2 к Государственной Фармакопее Украины**

*Доля В.Г., Товмасын Е.К., Гризодуб А.И., Георгиевский В.П.*

Контроль невидимых механических включений в лекарственных средствах для парентерального применения: изменения в статье Государственной Фармакопеи Украины ..... 39

Проект статьи «Механические включения: невидимые частицы» ..... 43

*Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.*

Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Бузины цветки» ..... 47

Проект монографии «Бузины цветки» ..... 52

*Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.*

Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Липы цветки» ..... 54

Проект монографии «Липы цветки» ..... 60

### **Фитохимические исследования**

*Литвиненко В.И., Попова Н.В., Павлова И.А.*

Исследование бергенина в растениях рода бадан ..... 62

*Бовтенко В.А., Рыбаченко А.И., Литвиненко В.И., Попова Т.П., Бобкова Л.Н.*

Стандартизация флавоноидного состава водно-спиртовых экстрактов листьев перечной ..... 67

*Керимов Ю.Б., Исаев Д.И., Деркач А.И.*

Получение и изучение эсцина из околоплодника *Aesculus hippocastanum* L. .... 71

### **Синтез и изучение фармакологического действия**

*Никитин В.А., Коваленко С.И., Беленичев И.Ф.*

Синтез некоторых производных 2-метил-4(3Н)-хиназолона, их физико-химические и биологические свойства ..... 74

### **Фармакологические исследования**

*Орлова И.Н.*

Изучение фармакокинетики гифларина — инъекционного препарата гипозотемического действия ..... 81

### **Аналитический обзор**

*Сичкарь Л.А., Дихтярев С.И.*

Способы выделения и очистки природных ингибиторов протеолитических ферментов ..... 84

К сведению авторов журнала «Фармаком» ..... 88



**85 РОКІВ**  
**ДЕРЖАВНОМУ ПІДПРИЄМСТВУ**  
**«ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВИЙ**  
**ЦЕНТР ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»**

Заснований у квітні 1920 року Хіміко-фармацевтичний інститут за 85 років свого існування перетворився на провідний науковий Центр, що відіграв основну роль у становленні та розвитку фармацевтичної прикладної та фундаментальної науки в колишньому СРСР та в Україні.

Продовжуючи славні традиції, співробітники Центру активно включилися у вирішення завдань, що стоять перед українською фармацією у XXI столітті. Фахівці ДП ДНЦЛЗ успішно розвивають пріоритетні напрямки фармацевтичної науки, здійснюють її комплексний розвиток, проводять фундаментальні дослідження та впроваджують їх у сучасне фармацевтичне виробництво.

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів» протягом своєї 85-річної діяльності активно сприяє вирішенню найголовнішого державного завдання — охороні здоров'я народу.

**Шановні колеги!**  
**Вітаємо Вас із ювілеєм!**  
Щиро дякуємо всім, хто причетний до славної  
діяльності Центру,  
за самовіддану працю та високий професіоналізм.  
Сподіваємося, що Ваша натхненна праця буде гідно оцінена  
нинішніми та прийдешніми поколіннями.  
Міцного Вам здоров'я, творчої наснаги, успіхів та плідної праці  
у благородній справі збереження здоров'я  
народу України.

Адміністрація ДП ДНЦЛЗ МОЗ і НАН України  
Адміністрація ДП НЕФЦ  
Редакція журналу «ФАРМАКОМ»

## До 85-річчя заснування Державного підприємства «Державний науковий центр лікарських засобів»



### В ПОСТОЯННОМ СТРЕМЛЕНИИ К ПРОГРЕССУ

(ВКЛАД ГП ГНЦЛС В РАЗВИТИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ  
НАУКИ И ПРОМЫШЛЕННОСТИ.  
ИСТОРИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)

Георгиевский В.П.  
директор ГП ГНЦЛС, д.фарм.н., чл.-корр. НАН Украины,  
засл. деятель науки и техники Украины

#### I. Истоки создания ГП ГНЦЛС

В 1899 году в г. Харькове было организовано Фармацевтическое общество, первым председателем которого был приват-доцент Императорского Харьковского университета Николай Петрович Красовский.

#### ХАРЬКОВСКОЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО

В соответствии с Уставом 1914 года перед  
Обществом стояли такие задачи:

Содействовать разработке научных и практических вопросов, относящихся к области фармации и смежных с нею наук

Заботиться о распространении научных и практических сведений в области фармации и смежных с нею наук

Способствовать развитию всех отраслей отечественной химико-фармацевтической промышленности

Повышать научный уровень работников отрасли

Учреждать курсы, институты

Цель Общества состояла в разрешении научных и практических вопросов, относящихся к области фармации и смежных с нею наук.

Во втором параграфе Устава было записано, что для достижения своей цели Харьковское фармацевтическое общество «открывает, с соблюдением соответствующих правил, аптеки, кабинеты для исследования, лаборатории, учреждает курсы, институты».

Харьковское фармацевтическое общество, реализуя свои права, в 1913 году положило начало химико-фармацевтическому и бактериологическому институтам. Поэтому **зарождением ГП ГНЦЛС** следует считать решение Харьковского фармацевтического общества об открытии химико-фармацевтического института, принятое в **августе 1913 года**.

Первым директором института (1913-1932) был профессор Абрам Давидович Розенфельд — фармацевт по образованию, получивший солидную подготовку в Военно-медицинской академии на кафедре профессора Н.П. Кравкова.

По оценке А.Д. Розенфельда «в царской России научно-исследовательских институтов по фармации не было». В конце XIX - начале XX вв. научно-исследовательская работа в России в области фармации «сводилась к диссертационным работам, проводившимся в лабораториях при кафедрах фармации, фармакогнозии, гигиены, судебной химии и фармакологии... в любой лаборатории, куда фармацевт мог получить доступ... Работы эти охватывали самые разнообразные вопросы фармации и смежных с ней наук... Не было единого руководства, единого направления в

выборе и разработке тематики, единого мнения в отношении ее теоретической и практической ценности».

Эти задачи и были поставлены для решения институтом. Однако первая мировая война, а затем Октябрьская революция поставили перед институтом ряд новых проблем.

И первой проблемой, как отметил профессор А.Д. Розенфельд в докладной записке (февраль 1920 года) в Харьковский губздравотдел, «большим злом аптечного дела... в связи с недостатком и дороговизной медикаментов, является фальсификация их, тем более циничная и опасная, что она направлена на больного человека. Аптечный рынок переполнен не только грубыми подделками под иностранную марку, но часто в заграничной оригинальной...упаковке отпускается препарат, ничего общего не имеющий с этикеткой».

## II. Становление ведущего научно-исследовательского фармацевтического института Украинской ССР (1920-1941)

10 марта 1920 года был опубликован Декрет Совета Народных Комиссаров УССР «О национализации Бактериологического, Химико-фармацевтического и Пастеровского институтов Харьковского медицинского общества».

Химико-фармацевтический институт после перехода в ведение Наркомздрава был назван экспериментальным.

27 апреля 1920 года приказом по Народному комиссариату здравоохранения было принято «Положение об Экспериментальном химико-фармацевтическом институте Нар-

комздрава». Намечены новые задачи, среди них основные: содействие развитию фармацевтической промышленности в Украине и, в связи с обилием фальсификатов на медицинском рынке, борьба с фальсификацией.

Следует отметить, что эти задачи, определенные в Положении об Институте, прошли через все 85 лет его деятельности.

Экспериментальный химико-фармацевтический институт в г. Харькове явился первым по времени основания и единственным в Украине научно-исследовательским институтом в области фармации.

Институт несколько раз переименовывался, переходил в подчинение Всеукраинскому Аптечному управлению, Народному комиссариату здравоохранения УССР, Министерству Здравоохранения СССР, Министерству медицинской промышленности СССР.

Характерным для института, как будет показано далее, является то, что вся его деятельность отражает отдельные этапы развития аптечного дела и фармацевтической промышленности страны, в которых он сыграл основополагающую роль.

В 1921-1929 гг. институт проводил анализ качества всех препаратов, находящихся на рынке Украины. В результате напряженной работы института количество фальсификатов в Украине, доходившее в 1920-21 гг. до 50 %, в 1925 году было снижено до 0.5 %. Сфера деятельности института к концу 20-х годов была расширена, и в его обязанности вменялось:

— руководство контрольно-аналитическими лабораториями системы Аптекоуправлений, организованными в 1928 году;

## 1920

В марте 1920 года А.Д. Розенфельд обратился в Наркомздрав УССР с докладной запиской

### «К вопросу об организации химико-фармацевтического производства»

В ней он писал, что «для правильного разрешения вопроса об организации химико-фармацевтического производства, ...необходимо объединить науку и практику, а в первую очередь поставить на разрешение ряд научных вопросов, имеющих важное практическое значение».

Для этой цели я считаю целесообразным создать Институт экспериментальной фармации».





- работы над VII изданием Фармакопеи СССР (введение в Фармакопею физико-химических методов биологической стандартизации сердечных гликозидов и алкалоидов спорыньи);
- изучение лекарственного сырья Украины: исследование украинской калины, украинской спорыньи, корня могильника - получен алкалоид гармин;
- руководство научным отделом основанного НКЗ Украины «Фармацевтического журнала».

«Переломным» годом в жизни института явился 1930 год.

Постановлением Наркомздрава УССР от **23 июня 1930 года** Экспериментальный химико-фармацевтический институт в г. Харькове был включен в систему Всеукраинского аптечного управления (ВАУ). Институт был реорганизован и, согласно данным Государственного архива Харьковской области, именовался с **апреля 1930 года Всеукраинским экспериментальным фармацевтическим институтом**.

Институт приблизил свою работу к нуждам аптечного и промышленного фармпроизводства в Украине, связав свою работу с галеновыми фабриками, аптечными предприятиями и крупным питомником лекарственных растений в Проскурово.

В 1935 году по своей структуре институт представлял собой комплексное научно-исследовательское учреждение. Главная задача института — глубокое и всестороннее изуче-

ние лекарственного вещества. В основе изучения - эксперимент как научно-обоснованный метод исследовательской работы.

Институт начал отсчет основным направлениям своей деятельности:

- создание научных направлений изыскания биологически активных веществ;
- технология изготовления лекарственных форм и контроль их качества.

При этом в основу работы Института был положен девиз: «От биологически активной субстанции - к созданию лекарственной формы и внедрению ее в производство».

**15 марта 1939 года** Наркомом здравоохранения УССР Калиниченко был утвержден Устав экспериментально-производственной химико-фармацевтической лаборатории при Украинском институте экспериментальной фармациии.

Лаборатория была создана для производства новых химико-фармацевтических препаратов по методам, разработанным в институте, а также для проведения экспериментально-производственных работ.

7 декабря 1939 года директор института М.А. Ангарская направила докладную записку Наркому здравоохранения Овсиенко, в которой отметила, что считает более целесообразным и правильным организовать на базе Украинского института экспериментальной фармациии научно-исследовательский химико-фармацевтический институт.

По мнению коллектива института, это создавало новые возможности развития химико-фармацевтической промышленности в Украине путем привлечения к работе института специалистов высокой квалификации.

На основании докладной записки директора института Наркому здравоохранения УССР **в марте 1941 года** Украинский институт экспериментальной фармациии был переименован в **Украинский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт** Народного комиссариата здравоохранения УССР.

В 1941 году в состав института входили:

- фармако-технологическая лаборатория;
- лаборатория фитохимии;
- фармакологическая лаборатория;
- фармакогностическая лаборатория;
- фармако-аналитическая лаборатория;
- лаборатория органического синтеза;
- лаборатория физической химии;
- лаборатория спецхимии;
- опытное поле лекарственных трав.

К 1941 году институт превратился в ведущий научно-исследовательский центр Украины, ставший в один ряд с научно-исследовательскими центрами в Москве и Ленинграде. Основными научными направлениями деятельности института стали:

1. Контроль качества лекарственных препаратов аптечного и заводского производства.

2. Изучение растительного лекарственного сырья как дикорастущего, так и культивируемого в СССР, с целью выделения биологически активных веществ и создание на их основе лекарственных препаратов.

3. Синтез новых лекарственных веществ.

4. Рациональное изготовление галеновых препаратов и лекарственных форм.

5. Руководство заводами по освоению производства препаратов и улучшению качества продукции.

С момента своего основания институт развил энергичную и успешную борьбу с наводняющими украинский рынок медикаментов фальсификатами, считая эту задачу первоочередной. Он первым в Советском Союзе приступил к систематической проверке качества лекарственных форм, изготовленных в аптеках и на предприятиях.

Эту работу институт проводил совместно с опорными пунктами, которых в системе Всеукраинского аптечного управления (ВАУ) в 1930-40 гг. было от 16 до 28. Опорными пунктами и институтом ежегодно проводилось около 40 тысяч исследований различных лекарственных средств.

Наряду с руководством работой опорных пунктов, институт осуществлял подготовку кадров путем повышения квалификации работников контрольно-аналитических лабораторий в фармако-аналитической лаборатории института, на курсах переквалификации, в аспирантуре и ординатуре.

В 1934-38 гг. институт развернул работу по применению физико-химических методов в исследовании фармпрепаратов.

Важнейшие работы института в этом направлении:

- колориметрия;
- рН-метрия;
- измерение поверхностного натяжения;
- применение люминесцентного анализа;
- хроматографический анализ галеновых препаратов;
- потенциометрическое титрование;
- биологическая стандартизация сердечных средств.

Работы института в области усовершенствования и выработки новых методов исследования лекарственных веществ внедрялись в фармацевтическую практику путем их передачи контрольно-аналитическим лабораториям системы Аптекоуправлений Украины и химико-фармацевтическому производству для применения в практической работе.

В 1938 году Украинский институт экспериментальной фармации вел работу по составлению Атласа лекарственных растений.

Разработанные институтом методы послужили материалом для составления статей Государственной Фармакопеи СССР VIII издания. Сотрудниками института было разработано свыше 40 статей, на 80 статей были даны рецензии.

Наряду с изучением растений, применяемых в официальной медицине, институт проводил изучение растений, применяемых в народной медицине. В 1936 году экспедицией института было обследовано несколько районов Украины.

В итоге работ по изучению лекарственного растительного сырья институтом были выработаны методы получения ряда лекарственных средств. Разработана методика получения 32 препаратов. Часть из них в 1936-37 гг. была передана на химико-фармацевтические заводы УССР для серийного производства.

Важнейшие из этих работ:

- кордигит — внедрен в производство на заводе «Здоровье трудящимся», г. Харьков;
- эрготрат;
- гармин — разработана методика получения препарата из корня *Reganum harmala*;
- франгулаксин — препарат в виде таблеток из крушины ломкой;
- катартин — сухой экстракт в виде пилюль;
- на опытном поле института была введена в культуру инсектисидная ромашка, а затем передана в лекарственные совхозы Украины для закладки товарных площадей.

В области синтеза фармацевтических препаратов наиболее важными работами, проведенными институтом в 1934-40 гг. были:

- синтез ртутного препарата «Мерсалин», который прошел клинические испытания и был передан для массового производства;
- синтез и передача на клинические испытания препарата теофиллин;
- синтез слабительного средства изафенин, которое было внедрено в производство в г. Киеве на заводе им. Ломоносова;

- синтез эпителизирующего средства, производного амида азотолуола, идентичного заграничным препаратам «Шарлах-Рот» и «Пелидол». Производство передано на завод «Красная Звезда», г. Харьков;
- получение дерматологического средства алоформ, заменявшего препараты ксероформ и дерматол, которые содержали импортный висмут. Производство было поставлено в г. Харькове на заводе «Красная Звезда»;
- получение кальция глюконата. Внедрен в производство в г. Харькове на заводе «Красная Звезда»;
- синтез снотворных и обезболивающих средств — производных барбитуровой кислоты. Синтезированы препараты, идентичные заграничным «Перноктону», «Эйнаркону», «Эвипану», «Эльдоралу» (внедрены в производство на заводе «Красная звезда»);
- синтез препарата золота — аурионатитиосульфата для терапии ряда кожных заболеваний, в том числе туберкулеза кожи;
- синтез консервантов — эфиров п-оксибензойной кислоты: нипагина, нипазола, агипана.

В результате работы по синтезу новых химиотерапевтических препаратов получено около двух десятков сульфамидных препаратов, например, сульфаниламидотиазол (стрептазол), не обладающий побочным действием, свойственным сульфидину.

Институтом была освоена методика изготовления сухих экстрактов с постоянным содержанием действующих начал, как основы для изготовления других галеновых препаратов (белладонна, ипекакуана, примула и др.)

Передавая препарат на завод, институт постоянно руководил работой по освоению способа получения и контролем качества разработанного им препарата.

По поручению Наркомздрава УССР издавался бюллетень института «Консультационные материалы». Задачами издания было предоставление научно-практических консультаций в области фармации и информирование о достижениях в этой области в СССР и за рубежом.

### **III. Институт в годы Великой отечественной войны и в послевоенные годы восстановления (1941-1951)**

5 октября 1941 года институт был эвакуирован из г. Харькова в г. Фрунзе (ныне г.

Бишкек) Киргизской ССР. Институт эвакуировался вместе с Харьковским химико-фармацевтическим заводом «Здоровье трудящимся». Адрес института во Фрунзе — улица Ворошилова, № 1.

Война затормозила, но не остановила выполнение основных задач института.

По заданию Аптечного отдела Наркомздрава СССР УНИХФИ осуществлял методическое руководство производством галеновых и химико-фармацевтических препаратов, оказание конкретной помощи в разработке методик, а также проводил контроль качества лекарственных препаратов путем изъятия проб изготовленной продукции и экстенпоральной рецептуры по всей аптечной сети аптекоуправлений Среднеазиатских республик.

Институт оказывал помощь Военно-инженерной академии в оборонных темах по разработке методов контроля и систематического анализа ГЛС.

Институтом проведено предварительное химическое и биологическое изучение 240 видов растений киргизской флоры.

В институте разработана лабораторная и полупроизводственная методика получения препаратов опия адсорбционным методом с использованием для этой цели местной глины. Метод получения был передан зональной станции Киргизского Лекрастреста.

Институт, переключив свою тематику в помощь фронту, достиг значительных успехов.

Учитывая серьезность борьбы с раневой инфекцией, в институте синтезировали новый сульфамидный препарат — стрептазол, не уступавший по своим свойствам сульфидину и не обладающий присущим последнему побочным действием.

УНИХФИ оказывал помощь Киргизскому аптекоуправлению в синтезе остродефицитных препаратов: нитроглицерина, эфира наркотического, инвертного сахара, хлористого кальция и др.

Для завода искусственных зубов была разработана методика получения фосфорной кислоты из костной золы, производилась очистка технической фосфорной кислоты, необходимой для получения дентина.

Получили высокоактивный антибактериальный препарат — аспергиллин.

За годы Отечественной войны институтом были проведены также следующие работы:

- разработана методика получения строфантина для инъекций. В связи с этим



Наркомздрав СССР исключил строфантин из импорта;

- для получения комплекса витамина В из пивных дрожжей на Фрунзенском пивоваренном заводе смонтирован цех и передана соответствующая методика;
- разработана производственная методика получения витамина А и экспериментально-производственной лабораторией института организован его выпуск;
- представлена лабораторная методика получения морфина, стрептоцида и новокаина в дюрантной форме, действие которой в 5-20 раз продолжительнее обычной.

В годы войны, наряду с научно-исследовательской работой, УНИХФИ в экспериментально-производственной лаборатории выпускал наиболее дефицитные, не производившиеся на заводах препараты, такие как строфантин и каротин.

23 августа 1943 года г. Харьков был освобожден от немецко-фашистских захватчиков.

24 августа 1944 года в помещении института (ул. Юмовская, 7) состоялась научная конференция УНИХФИ, посвященная первой годовщине освобождения г. Харькова от немецко-фашистских оккупантов.

Конференция проходила с участием кафедры фармакологии Харьковского медицинского института (проф. А.М. Утевский), Харьковского фармацевтического института (проф. Н.П. Красовский), Института патологии и гигиены труда (Окунь), Института экспериментальной эндокринологии (Булон), Харьковского областного аптекоуправления (зав. контрольно-аналитической лабораторией М.А. Сольц), завода «Красная Звезда» (Дымарская и Кирич). В числе приглашенных был профессор Н.А. Валяшко. В конференции участвовало 24 сотрудника УНИХФИ. Председательствовала на конференции директор института М.А. Ангарская.

Были заслушаны доклады, с которыми выступили доктор биологических наук О.И. Файншмидт («Об антибактериальных веществах, вырабатываемых микроорганизмами») и профессор Н.А. Измайлов («Ускоренный метод оценки устойчивости жидких препаратов витамина С»). Доклад Н.А. Измайлова был посвящен пионерской работе, определившей начало разработки метода ускоренного старения.

В мае 1945 года штат УНИХФИ составлял 83 сотрудника. Из них — 4 доктора наук, 9 кандидатов наук, 18 научных сотрудников. К

этому времени было выполнено 4 кандидатских диссертации, выполнялось 4 докторских и 5 кандидатских диссертаций.

По оценке научных работников Всесоюзного научно-исследовательского химико-фармацевтического института (г. Москва), изучавших работу института в мае 1945 года, УНИХФИ являлся «научным центром Украины по созданию и изучению новых лекарственных средств». Широкий спектр работ института соответствовал его роли отраслевого института украинской химико-фармацевтической промышленности.

В мае-июне 1945 года был организован, вновь после эвакуации, Ученый совет УНИХФИ. 30 мая 1945 года приказом по Украинскому научно-исследовательскому химико-фармацевтическому институту был утвержден Ученый совет, в состав которого, наряду с заведующими научных подразделений, вошли: Д.Г. Колесников — заместитель директора по научной части; А.М. Утевский — член-корреспондент Академии наук СССР, заведующий биологическим отделом; С.Я. Штейнберг — доктор медицинских наук, заведующий кафедрой госпитальной терапии Харьковского медицинского института; А.М. Цейтлин — доктор медицинских наук, заведующий кафедрой госпитальной хирургии ХМИ; Н.А. Валяшко — доктор химических наук, заведующий кафедрой органической химии Харьковского фармацевтического института; Н.П. Красовский — доктор фармацевтических наук, заместитель директора по научной части ХФИ; А.М. Кричевский — профессор, директор Института венерологии и дерматологии.

В 1946-50 гг. перед УНИХФИ, помимо углубления научно-исследовательской работы, стояла задача оказания технической помощи восстановлению химико-фармацевтической промышленности УССР. Необходимо было наладить производство новых лекарственных средств из растений и синтетических препаратов для борьбы с сифилисом, туберкулезом и др. болезнями.

Приказом Министра медицинской промышленности СССР от 10 июля 1946 года УНИХФИ был переименован в **Харьковский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт (ХНИХФИ)**.

В 1947 году отделом науки Министерства медицинской промышленности СССР было сделано заключение о работе Харьковского научно-исследовательского химико-фармацевтического института и утверждены Поло-

жение о Харьковском научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте, Устав экспериментально-производственной лаборатории института, а также персональный состав Ученого совета института.

Структура ХНИХФИ, согласно Положению, включала:

- фармако-химический отдел с лабораториями: синтеза химико-терапевтических препаратов; синтеза металлоорганических соединений; по изучению растений, применяемых в народной медицине; алкалоидной; гликозидной, органической технологии; синтеза бактерицидных веществ; физикохимии; фармакотехнологии;
- биологический отдел с лабораториями биологической стандартизации лекарственных препаратов; экспериментальной фармакологии; по изучению растений, применяемых в народной медицине; микробиологии; биохимии; виварий;
- опытное поле лекарственных растений;
- научно-организационный отдел;
- административно-хозяйственный отдел;
- производственно-экспериментальная лаборатория.

В соответствии с Положением, ХНИХФИ готовил аспирантов по специальностям: фармацевтическая химия, биохимия, фармакология.

4 августа 1948 года Управлением химико-фармацевтической промышленности Министерства здравоохранения СССР был издан приказ «Об улучшении связи между институтами и предприятиями химико-фармацевтической промышленности». Приказом было произведено распределение заводов по институтам для обслуживания их консультантами и утверждено «Положение о консультантах заводов, выделенных институтами, подведомственных управлению химико-фармацевтической промышленности Министерства здравоохранения СССР».

#### **IV. ХНИХФИ — ведущий научно-исследовательский институт СССР в области технологии фитохимических препаратов и готовых лекарственных средств (1951-1965)**

Являясь отраслевым, институт консультировал 15 химико-фармацевтических заводов: Ленинградский химико-фармацевтический завод № 1; Московский химико-фармацевтический завод № 9, Рижский химико-фармацевтический завод № 6, Горьковский химико-

фармацевтический завод, Воронежский химико-фармацевтический завод, Курский химико-фармацевтический завод, Казанский химико-фармацевтический завод, Ростовский химико-фармацевтический завод, Новосибирский химико-фармацевтический завод, Хабаровский химико-фармацевтический завод, Таллиннский фармацевтический завод, Львовский химико-фармацевтический завод, Сталинградский завод горчичников, Харьковские заводы «Здоровье трудящимся» и «Красная звезда».

Ко всем заводам были прикреплены консультанты для оказания постоянной помощи в вопросах производства.

С 10 по 30 мая 1952 года в ХНИХФИ проходили занятия курсов по физико-химическим методам анализа для работников экспериментальных и аналитических лабораторий заводов Главхимфармпрома. В их организации принимала участие кафедра физической химии Харьковского государственного университета.

Курсы преследовали цель помочь работникам заводских лабораторий овладеть основными методами физико-химического анализа, познакомить их с новыми методами анализа (полярография, хроматография, титрование в неводных растворителях) и способствовать успешному и скорейшему внедрению физико-химических методов анализа в производственную практику.

**В июне 1958 года** экспериментально-производственная лаборатория ХНИХФИ по приказу министра здравоохранения была реорганизована в **Опытный завод ХНИХФИ**.

К **1950 году** институт практически полностью восстановил все научные направления, очерченные в довоенные годы. Умение работать в полном цикле по созданию фитохимических препаратов - от поиска до внедрения в производство - было показано при создании препаратов келлин (из амми зубной) — лечебно-профилактического средства, применяемого при стенокардии, инфаркте миокарда, бронхиальной астме и коклюше, и раунатин (суммарный препарат из раувольфии змеиной, обладающий гипотензивным действием). Причем, создание последнего прошло в очень сжатые сроки при большой конкуренции со стороны ВНИХФИ, конкуренции, из которой институт вышел победителем.

**1955-1965 гг.** явились годами «золотой эры» научных исследований и подготовки кадров высшей квалификации. Руководство

института понимало, что без привлечения молодых одаренных специалистов будущее невозможно. Поэтому в **1957-1960 гг.** в институт были приглашены 37 слушателей расформированного Военно-фармацевтического факультета при Харьковском фармацевтическом институте, а также около 20 выпускников Харьковского фармацевтического института, Харьковского государственного университета, Харьковского медицинского института. Все молодые специалисты были распределены в лаборатории и закреплены за ведущими специалистами.

По изучению лекарственных растений, выделению, установлению структуры биологически активных веществ и созданию технологии получения фитохимических субстанций к Д.Г. Колесникову, И.Г. Зозу, З.В. Сове, В.Я. Тропп, А.П. Прокопенко, В.Т. Чернобаю, Н.П. Максютиной, Е.В. Титову, Ю.В. Шостенко были прикреплены И.Ф. Макаревич, Н.Ф. Комиссаренко, В.И. Литвиненко, А.Ф. Ковалев, В.В. Затула, В.Н. Спиридонов, А.Г. Горин, А.А. Резниченко, В.С. Батюк, Г.А. Жуков, Л.И. Драник, В.А. Дадали, И.П. Ковалев, П.П. Хворост, В.Д. Чмиль, Ю.И. Игнатова.

По синтезу лекарственных и вспомогательных веществ — к М.Х. Глузману, Б.Г. Ясницкому, Е.Б. Дольберг, С.А. Саркисьянц — Г.С. Башура, Е.Г. Иванюк, Г.И. Коваленко, В.А. Оридорога, А.П. Зайцев, Ц.И. Сатановская, О.О. Комаров, Т.В. Медведева, И.Е. Коробейникова.

По фармацевтической технологии к С.А. Носовицкой, Ф.А. Коневу, Н.А. Бугрим были прикреплены Е.Е. Борзунов, Р.М. Сафиулин, Ю.Б. Борисенко, И.К. Курченко, В.В. Тимофеев, Н.И. Крайнюков, М.В. Штейнгарт, В.И. Левченко, Т.Я. Несмиян;

По фармацевтическому анализу — к С.М. Болотникову, М.С. Штрайбер, Г.Я. Хаит, Н.П. Дзюбе — В.В. Беликов, В.П. Георгиевский, И.Я. Царенко, Н.А. Казаринов, Н.Е. Воробьев, В.Т. Шилов, В.И. Коваленко, Л.Я. Сиренко.

Для обеспечения указанных направлений фармакологическими исследованиями были созданы 2 фармакологические лаборатории во главе с М.А. Ангарской и Я.И. Хаджаем. Сотрудниками этих лабораторий стали П.И. Безрук, В.Е. Соколова, Э.И. Генденштейн, В.Ф. Кузнецова, Г.В. Оболенцева, а в последствии — С.И. Лутохин, Л.А. Любарцева, Ж.А. Любецкая, Л.Я. Топчий, Н.А. Кистень, Е.А. Васильченко, Л.А. Чайка.

В эти годы завершены основополагающие исследования, послужившие становлению ХНИХФИ как головного отраслевого научно-исследовательского учреждения в системе Министерства здравоохранения СССР:

- проведены исследования более 2 тысяч видов лекарственных растений на основе созданных новых методик обнаружения, идентификации и установления структуры известных и новых природных соединений;
- проведены поисковые (скрининговые) исследования по выявлению определенных типов биологической активности, связи строения БАВ с действием;
- проведены работы по совершенствованию существующих и разработке новых технологий получения суммарных и индивидуальных препаратов с последующим созданием на их основе готовых лекарственных форм.

Практические результаты этих исследований стал выпуск ОЗ ХНИХФИ, заводом «Здоровье трудящимся», Львовским ХФЗ, Одесским ХФЗ лекарственных препаратов:

- содержащих сердечные гликозиды: коргликон, дигитоксин, дигоксин, гитоксин, строфантин-К, кордигит, гомфотин, корельборин, корезид;
- содержащих кумарины, фурукумарины, хромоны: из семян пастернака — пастинацин, бероксан, из семян моркови — даукарин, из семян амми — келлин и ависан;
- содержащих флаваноиды: сухой экстракт бессмертника, фламин.

Из корней раувольфии получены препараты гипотензивного действия: антиаритмическое средство аймалин, алкалоид резерпин, суммарный препарат раунатин.

Из спорыньи получен суммарный препарат эрготал, а на основе выделенного алкалоида эрготоксина получен дигидроэрготоксин, обладающий симпатоблокирующим действием.

Из листьев подорожника получен противоязвенный препарат плантаглоцид, содержащий полисахариды.

На основе комбинации флавоноидов и келлина создан препарат викалин, ставший в те годы одним из основных препаратов для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Разработка фундаментальных вопросов теории и практики адсорбционной технологии выделения лекарственных веществ рас-

тительного происхождения осуществлена на примере выделения опийных алкалоидов.

Была создана оригинальная адсорбционная технология производства морфина из корочек масличного мака, позволяющая создать промышленную технологию производства морфина на Чимкентском ХФЗ.

Получили завершение экспериментальные, переросшие в фундаментальные, исследования по созданию новых видов химического сырья и его комплексному использованию с целью производства основных продуктов синтеза лекарственных средств. Изучена химия хлорацетальдегида (ХАА), его строение, свойства и реакционная способность, теоретически обоснован способ его получения окислением хлорвинила хлором в периодическом и непрерывных вариантах. Это позволило организовать на ХФЗ «Красная звезда» и ПО «Органика» (г. Новокузнецк) производство ХАА и его димергидрата. Изучен также процесс фотохимического хлорирования ХАА и его окисления азотной кислотой.

Данные исследования позволили разработать промышленные технологии производства норсульфазола, нитазола на Ирбитском ХФЗ, циминаля на Новокузнецком ПО «Органика».

Изучены процессы модификации природных полисахаридов с целью создания вспомогательных химико-фармацевтических веществ, в частности, изучены основные закономерности окисления целлюлозы тетраоксидом азота и предложен механизм образования монокарбоксиметилцеллюлозы. Решение вышеназванных задач позволило на основе монокарбоксиметилцеллюлозы организовать на Лубенском ХФЗ производство марли кровоостанавливающей и вискозы гемостатической (препараты последней в виде турунд были включены в аптечки для космонавтов), а также препаратов оксицилодекса, коноксидека и шовных рассасывающихся препаратов «Окцелон», «Амицелон».

Впервые показана возможность осуществления реакции между органическими реагентами в твердой фазе. В частности, исследование твердофазных органических реакций обосновало разработку новых технологических приемов для производства фталазола, солипирина. При этом из производства исключались взрыво- и пожароопасные органические растворители, увеличивался выход и снижалась стоимость продукции. В результате на ХФЗ «Красная звезда» без расширения площадей и парка оборудования мощность цеха синтеза увеличилась в 50 раз!

Для создания высокоэффективных и стабильных при длительном хранении лекарственных средств с заданным высвобождением осуществлена разработка и организовано производство метилацетилцеллюлозы, оксипропилметилцеллюлозы, натрий карбоксиметилцеллюлозы. При изменении концентраций водных растворов этих компонентов получают основы, имеющие консистенции: от легкотекучих жидкостей до твердых структурированных гелей.

Разработана технология получения полиэтиленоксидов различной молекулярной массы, спиртов шерстного воска, жидких ланолинов и их производных; поверхностно-активных веществ (ПАВ) (их основное назначение — обеспечить гомогенность масс, содержащих водно- и жирорастворимые вещества); солюбилизаторов — оксиэтилированного касторового масла и твинов 20, 40, 60 и 80. Последние, являясь солюбилизаторами и имея высокое значение гидрофильного-липофильного баланса, способны обеспечить перевод в водный раствор нерастворимых в воде лекарственных веществ.

Благодаря этим работам по вспомогательным веществам в Советском Союзе создана новая отрасль промышленности - производство синтетических материалов для химико-фармацевтической промышленности. В частности, в Усолье-Сибирском освоено производство метилцеллюлозы, в Намангане и на Шосткинском заводе химреактивов — натрий карбоксиметилцеллюлозы, в Олайне и Владимире — производство ацетилфталилцеллюлозы; на п/я 8333 г. Казань, ХФЗ «Красная Звезда» — полиэтиленоксидов, на Долгопрудницком химкомбинате — сплена-80 и твина-80, на Ростовском ХФЗ — жидкого ланолина.

В технологии изготовления таблетированных препаратов начаты работы по исследованию влияния технологических свойств лекарственных и вспомогательных веществ (разрыхляющих, скользящих) на качество твердых лекарственных форм. Разработана технология получения пелет и мозаичных таблеток, пролонгированных и кишечнорастворимых таблеток, введена в практику таблеточного производства технология отдельной грануляции; изучены режимы покрытия таблеток пленками ацетилфенилцеллюлозы и их совместимость с лекарственными веществами. На основании этих исследований совместно со специалистами ОЗ ХНИХФИ был создан опытный участок производства.

Работы по созданию скорректированных форм для детей принесли институту известность и приоритет в разработке и внедрению в промышленное производство препаратов для детей.

Проведено исследование в области анализа структуры и экономики готовых лекарственных средств и изыскание путей расширения их промышленного производства. Было показано, что одним из реальных источников увеличения выпуска ГЛС является перевод значительной части экстенпорально изготавливаемых в аптеках лекарств на промышленное производство. Более 60 прописей были одобрены Фармакологическим комитетом МЗ СССР. Это был первый шаг в создании комбинированных лекарственных препаратов отечественного производства: таблеток «Папазол», таблеток димедрола с теофилином, таблеток «Викалин», таблеток папаверина с платифиллином, раствора глюкозы с аскорбиновой кислотой и др.

В это время проводилось изучение и разработка новых принципов ампулирования инъекционных растворов и совершенствование существующих технологий их производства. В результате разработаны оригинальные принципы: пароконденсационная циркуляция жидкостей в ампулах, ампулирование нестойких растворов лекарственных веществ с применением в качестве защиты газовой фазы, очистка растворов от механических загрязнений с помощью комбинированных фильтрующих перегородок. Работы внедрены на ОЗ ХНИХФИ при ампулировании глюкозы, папаверина, дибазола, строфантина, глюкозы с аскорбиновой кислотой.

Появилось новое направление в работе технологических лабораторий — создание оборудования для заводов отрасли (работы проводились совместно с СПКБ Медпром (г. Ленинград) и ОЗ ХНИХФИ). В результате созданы автоматизированная фильтровальная система, установка для однократной термической и многократной пароконденсационной промывки ампул и флаконов, машина для резки капилляров ампул.

Совместно с ОЗ ХНИХФИ разработан промышленный образец установки для получения дистиллированной воды, полуавтомат для закатки мелкоемких ампул, прибор для контроля отдельных частиц в протекающей жидкости, теплофизический влагомер, изготовлен опытный образец сушилки в кипящем слое.

В связи с организацией полного цикла исследований при создании лекарственных препаратов аналитическая служба института проводила разработку физико-химических методов контроля качества не только субстанций и готовых лекарственных форм, но и методов контроля сырья и процессов производства.

Разработаны методики контроля субстанций, ингредиентов комбинированных лекарственных препаратов методом кислотно-основного титрования в неводных растворителях; таблеток, содержащих производные пирозолона и барбитуратов, аспирина и кофеина, аспирина, кофеина и фенацетина; лекарственного сырья — раувольфии змеиной и белладонны, основных групп алкалоидов в раунатине. Полярнографический метод получил развитие в анализе опийных алкалоидов, алкалоидов раувольфии, комплексометрический метод — в анализе готовых лекарственных форм. Широкое распространение приобрел метод бумажной хроматографии.

Для идентификации лекарственных веществ внедрены методы ИК-спектрофотометрии и дисперсии оптического вращения.

Издан первый в СССР атлас ИК-спектров сердечных гликозидов, флавоноидов и кумаринов. Работы аналитиков, затрагивающие различные направления фармацевтического анализа, нашли отражение в технических условиях, фармакопейных статьях и Государственной Фармакопее СССР IX издания.

В связи с реорганизацией Совнархозов и передачей предприятий Минздраву СССР, количество заводов, обслуживаемых институтом, в 1966 году возросло до 30. Институт и руководство Министерства проводили ежегодные координационные совещания с заводами.

#### **V. ХНИХФИ — научно-производственная база по поиску и созданию готовых лекарственных средств предприятий медицинской промышленности СССР (1965-1981)**

Учитывая значимость проводимых научных исследований в ХНИХФИ для медицинской промышленности, Министерством в 1966 году было принято решение о строительстве нового здания института, состоящего из 4 корпусов, технического блока, одноэтажного главного корпуса, парокотельной и опытного завода. Фактически проект предусматривал создание единой научно-производ-

ственной базы для научного поиска, создания готовых лекарственных средств с передачей этих разработок через Опытный завод на все заводы Советского Союза.

Создание такого единственного в стране научного центра поставило перед институтом ряд новых вопросов по изменению его структуры с целью более широкого охвата всех направлений: от поиска, разработки — до передачи нормативно-технической и аналитической документации и оказания помощи заводам по внедрению и выпуску новых лекарственных средств.

В течение 1965 года на базе существующих лабораторий были созданы лаборатория изыскания фитохимических препаратов, лаборатория технологии фитохимических производств, лаборатория фармацевтической технологии, лаборатория готовых лекарственных форм, лаборатория процессов и аппаратов, лаборатория механизации и автоматизации, лаборатория технико-экономических исследований.

Совместным Приказом Министерства медицинской промышленности СССР и Министерства здравоохранения СССР в мае 1968 года создана лаборатория аэрозолей.

В июле 1970 года в соответствии с распоряжением Государственного комитета по науке и технике Совета Министров СССР организована лаборатория фитоферментных препаратов.

Во исполнение Постановления ЦК КПСС и Совета Министров СССР от 10 ноября 1970 года № 987 и Приказом Министра медицинской промышленности СССР от 9 февраля 1971 года № 67 «О повышении роли стандартов в улучшении качества выпускаемой продукции» в апреле 1971 года создана лаборатория стандартизации и метрологии. В 1969 году организованы группы научной организации труда, патентоведения, научно-технической информации, научного планирования и отчетности.

Увеличение объемов внедрения лекарственных средств требовало более четкого направления исследований каждого из структурных подразделений института. С этой целью в 1972 году на базе лаборатории фармацевтической технологии создается отдел таблетированных лекарственных средств, а в 1977 году - лаборатория готовых лекарственных форм сформулировала окончательно свое направление созданием отдела инъекционных лекарственных средств. Отдел включил в себя 2 лаборатории: лабораторию инъ-

екционных лекарственных средств и лабораторию ампулирования.

Правительство Украины оценило вклад ХНИХФИ в развитие химико-фармацевтической промышленности. Указом Президиума Верховного Совета УССР от **14 мая 1971 года** Харьковский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт был награжден **Почетной Грамотой Президиума Верховного Совета Украинской ССР.**

В **1975-81 гг.** ХНИХФИ решил для отрасли следующие основные вопросы.

По изысканию биологически активных веществ растительного происхождения и в области промышленной технологии фитохимических препаратов.

На основе комплексной переработки сырья и рациональной организации производств созданы более совершенные технологии получения фитопрепаратов:

- освоена переработка соцветий бессмертника песчаного с получением фламина и экстракта бессмертника (Львовский ХФЗ);
- разработана новая технология переработки листьев наперстянки с получением кордигита и гитоксина;
- освоена новая технология переработки коробочек мака с получением наряду с морфином, кодеина, наркотина и наркоталина и экономией до 170 т сырья (Чимкентский ХФЗ);
- разработана комплексная технология переработки корней и корневищ солодки голой с получением ликвиритона, ликуразида, халкорина, глицирама, экстрактов медицинского и технического назначения (ХФЗ «Здоровье трудящимся»);
- освоена комплексная переработка свежих листьев подорожника большого с получением сока и плантаглюцида (из шрота после отделения сока);
- освоена комплексная переработка плодов шиповника с получением холосаса, масла шиповника и каротиноидного препарата (Одесский ХФЗ);
- разработана комплексная переработка соцветий ноготков (календулы) для получения флавоноидного (калефлон) и каротиноидного (карофиллен) препаратов.

Эти тенденции в дальнейшем получили развитие и с другими объектами. Например, ранее в лекарственный препарат перерабатывались только корни алтея лекарственного, а надземная часть являлась не утилизиру-

емой. К настоящему времени из травы алтея получен ценный препарат мукалтин, потребность в котором в течение 2-3 лет возросла в десятки раз (ОЗ ХНИХФИ, Львовский ХФЗ).

— показаны пути создания новой технологии с применением сжиженных газов для экстракции комплексов липофильных веществ (ОЗ ХНИХФИ).

— интенсивно развивались исследования в области химии природных соединений. Наместились работы по хеморесурсоведческому поиску и выявлению зависимости распространения отдельных групп веществ в различных родах и семействах растений.

ХНИХФИ совместно с заводами систематически проводилась работа по испытанию и внедрению в производство новых более прогрессивных видов оборудования, главным образом заимствованных из других отраслей промышленности (химической, пищевой и др.). Эти работы позволили значительно улучшить аппаратное оснащение стадий упаривания и сушки экстрактов, стадии измельчения растительного сырья (Львовский ХФЗ, Лубенский ХФЗ, ХФЗ «Здоровье трудящимся»).

Важным направлением в создании фитохимических препаратов становится использование ферментных систем растений:

— создан липолитический фермент нигидаза (Одесский ХФЗ).

По созданию и совершенствованию технологий изготовления ГЛС:

— определены технологические режимы (пеннообразования, эмульгирования, пленкообразования) и заложены основы дальнейшего прогресса в области создания оригинальных аэрозолей для лечения бронхиальной астмы, сердечно-сосудистых заболеваний, для применения в гинекологии, проктологии, хирургии, пульмонологии, в специальных целях и др. Препараты ливиан, олазол и камфомен хорошо зарекомендовали себя при работе в космосе на орбитальных станциях. Практическим итогом работы явилось создание совместно с Законом медицинских пластмасс и стоматологических материалов (ныне АО «Стома», г. Харьков) и организация массового производства принципиально новой лекформы — медаэрозолей. До распада СССР производилось более 25 млн. уп. аэрозолей более 20 наименований. Сформулированы медико-технические

требования к материалам и разработаны нормативно-технические требования к фармакопейным статьям на аэрозольные препараты;

— созданы глазные капли пролонгированного действия с метилцеллюлозой, альбумидом, пилокарпином, скополамином (ОЗ ХНИХФИ).

— разработаны требования и новые методики определения основных физико-химических характеристик, пригодных для использования в капсулированных лекарственных формах, оказана научно-консультативная помощь в организации производства оболочек твердых капсул на Московском ХФЗ им. Карпова, мягких желатиновых капсул на ПО «Октябрь» (г. Ленинград) и Горьковском ХФЗ;

— на основе новых синтетических материалов впервые разработаны двухслойные суппозитории, внедренные совместно с сотрудниками ЦЗЛ на Горьковском ХФЗ;

— разработана новая лекарственная форма — повязки для лечения ран для Министерства обороны СССР;

— совместно с учеными Харьковского НИИ криобиологии и криомедицины проведены работы по применению полиэтиленоксида-400 в качестве криофилактика — ингредиента, позволяющего обеспечить сохранность органов и тканей при низких температурах и являющегося средой их сохранения;

— изучены процессы хроматографической очистки ряда красителей и взаимодействия красителей дихлортриазинового ряда с олиго- и полисахаридами природного и синтетического происхождения, что позволило на заводе химических реактивов (г. Шостка) решить вопрос производства очищенных красителей кислотного красного 2С и тропеолина 0, а также организовать промышленное производство цветных сахаров (рубержозум, церулезум, флаварозум);

— после изучения основных закономерностей выделения галловой кислоты из природного танинсодержащего сырья был предложен механизм гидролитического разложения танина, что позволило усовершенствовать производство галловой кислоты на ПО «Грузхимфарм» в более экономичном варианте, а также разработан способ получения синтетической галловой кислоты;

— изучены процессы получения 8-оксихинолина — полупродукта синтеза целого ряда лекарственных препаратов, что позволило разработать технологию его производства, которая была апробирована на Киевском ХФЗ им. Ломоносова.

В области стандартизации институтом совместно с заводами отрасли проведен пересмотр всех фармакопейных статей и большинства технических условий, утвержденных до **1966 года**. Значительная часть документов была пересмотрена **в 1971 году** — 604 документа.

За период **1964-75 гг.** сотрудниками защищено 60 кандидатских и 8 докторских диссертаций, опубликовано свыше 1600 научных работ, получено более 100 авторских свидетельств на изобретения.

**В конце 1975 года** в ХНИХФИ работало 499 чел., в том числе научных сотрудников — 176, инженеров — 57.

На научно-исследовательские, опытно-конструкторские работы на **1971-75 гг.** планировались затраты в сумме 16 992 000 руб., в том числе в 1975 году — 4 205 000 руб.

#### **VI. ВНИИХТЛС — головная организация по химии и технологии лекарственных средств СССР (1982-1991)**

На основании решения коллегии Государственного комитета СССР по науке и технике от 1 августа 1978 года (протокол № 38) «О преобразовании Харьковского научно-исследовательского химико-фармацевтического института Минмедпрома СССР во Всесоюзный научно-исследовательский институт химии и технологии лекарственных средств» **20 января 1982 года** Министром медицинской промышленности А.К. Меланиченко был издан Приказ № 19.

Суть приказа заключалась в следующем.

1. Преобразовать Харьковский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт во **Всесоюзный научно-исследовательский институт химии и технологии лекарственных средств (ВНИИХТЛС)**.

2. Установить следующие основные направления научной деятельности Всесоюзного научно-исследовательского института химии и технологии лекарственных средств:

— поиск физиологически активных соединений, выделяемых из растений, и создание на их основе фитохимических лекарственных препаратов;

— изучение структуры физиологически активных соединений, выделяемых из растений, и изучение молекулярно-биологических основ их взаимодействия с клеткой организма;

— разработка методических основ проведения исследований по созданию готовых форм лекарственных препаратов, в том числе детских лекарственных форм и вспомогательных материалов;

— разработка новых и совершенствование действующих технологических процессов получения фитохимических препаратов;

— разработка и совершенствование технологических процессов производства готовых форм лекарственных препаратов, включая детские лекарственные формы;

— разработка прогнозов и предложений в области экспериментального изучения и создания готовых форм лекарственных препаратов, в том числе детских форм и вспомогательных материалов.

3. Опытный завод Харьковского научно-исследовательского химико-фармацевтического института Министерства медицинской промышленности впредь именовать: «Опытный завод Всесоюзного научно-исследовательского института химии и технологии лекарственных средств (Опытный завод ВНИИХТЛС)».

4. Отнести Всесоюзный научно-исследовательский институт химии и технологии лекарственных средств к первой категории по оплате труда работников.

5. Подчинить Всесоюзный научно-исследовательский институт химии и технологии лекарственных средств Всесоюзному промышленному объединению по производству готовых лекарственных средств (объединению «Союзлексредства»).

Таким образом, окончательно узаконено положение института как научно-исследовательского учреждения Всесоюзного значения.

В соответствии с новым статусом и направлением работ, в 1982-1991 гг. ВНИИХТЛС провел следующие исследования:

1. Изучение процессов получения альгиновой кислоты и ее солей, что позволило организовать на Архангельском водорослевом комбинате промышленное производство вспомогательного вещества — альгината натрия для медицинских целей, на Днепродзержинском опытно-производственном пред-



**Руководители УЭФИ-УИЭФ-УНИХФИ-ХНИХФИ-ВНИИХТЛС**



1913-1932  
**Абрам Давидович  
Розенфельд**  
д.ф.н., профессор  
[1872-1936]



1932-1935  
**Полина Павловна  
Кремянская**  
провизор  
[1903-1993]



1936-1939  
**Николай Иванович  
Луганский**  
д.м.н., профессор  
[1906-1986]



1939-1966  
**Мария Андреевна  
Ангарская**  
д.ф.н., профессор  
[1907-1996]



1958-1968  
директор  
ОЗ ХНИХФИ  
**Федор Михайлович  
Пичахчи**  
[1909-1968]



1967-1977  
**Надежда Петровна  
Дзюба**  
к.х.н.



1968-1986  
директор  
ОЗ ХНИХФИ  
**Владимир  
Александрович  
Бирюк**  
к.ф.н.  
[1936-1987]



1977-1989  
**Федор Андреевич  
Конев**  
д.ф.н., профессор  
[1924-2005]

приятии государственной фирмы «Днепромед» — лечебно-профилактического препарата противоязвенного и радиопротекторного действия альгигель. Кроме того, разработаны технологии производств нетканого гемостатического рассасывающегося альгинатного материала ГРАМ, вспомогательного вещества — кальций-натрий-альгината (технология апробирована на ОЗ ГНЦЛС).

2. Начато новое направление, развивающееся и в настоящее время: изучение получения ряда аминокислот и их солеобразования с одно- и двухвалентными катионами с целью создания лекарственных препаратов разной направленности действия. При этом разработаны экономически выгодные технологии производства:

- аспарагиновой кислоты, ее калиевой и магниевой солей (внедрены на заводе химреактивов (г. Ереван), ОАО «Краситель» (г. Рубежное), ФФ «Здоровье» и ХФЗ «Красная звезда»);
- препарата аспаркам;
- аминокaproновой и ε-ацетил-аминокaproновой кислот (внедрены на заводах химреактивов в г. Харькове и г. Ереване);
- лекарственного препарата для лечения патологии опорно-двигательного аппарата ацемин (ХФЗ г. Новосибирск, ХФЗ г. Чимкент, ФФ «Здоровье»), лекарственной формы для питья (Новосибирский ХФЗ) и мази (Горьковский ХФЗ).

3. В 1987 г. институт приступил к реализации первой отраслевой программы по созданию и организации производства новых вспомогательных веществ (ВВ). Результатом проведенных изысканий явилась разработка ряда красителей и цветных сахаров, производных альгиновой кислоты, модифицированной целлюлозы и модифицированного крахмала. Кроме того, были проведены исследования по получению твина-80 медицинского достоинства, технология производства которого внедрена на Заводе тонкого органического синтеза (г. Ивано-Франковск), и неводного растворителя для инъекционных препаратов — этилолеата — этилового эфира олеиновой кислоты.

4. Впервые разработаны отечественные препараты на основе кортикостероидов — мази гидрокортизоновая, преднизолоновая, «Синафлан», «Триакорт», «Сульфокорт», линимент «Синафлан» и др.

5. Большое внимание было уделено созданию новых препаратов в форме суппозитори-

ев и мазей на различных типах основ и развитию их производства, прежде всего на Горьковском ХФЗ: более 20 наименований суппозиторий, 16 наименований мазей, суспензий, эмульсий, которые до настоящего времени пользуются высоким спросом.

6. Впервые в СССР создана инъекционная лекарственная форма растворимого аспирина — ацелизин, а также лекарственные формы ацелизина: порошок для питья и свечи.

7. На основе разработок ВНИИХТЛС в г. Бийске на комбинате «Алтайвитамины» создано производство аэрозолей «Алазоль», «Гипозоль», «Ингалипт», «Нитазоль» и др.

8. Одними из важнейших направлений работ ВНИИХТЛС являлись исследования по созданию лекарственных средств для детей, которые проводились как в направлении поиска новых эффективных субстанций, так и в направлении расширения ассортимента лекарственных форм. Были изучены, предложены для применения и внедрены в производство свечи с димедролом, таблетки глутаминовой кислоты, бутадiona, бензонала, димедрола, фенobarбитала, папаверина и др. Специалистами института были разработаны и утверждены Фармакологическим комитетом МЗ СССР основные медико-технические требования к детским лекарственным формам (ДЛФ).

Благодаря оригинальным составам и способам получения многие ДЛФ для орального применения превосходят по ряду качественных показателей аналоги для взрослых и защищены авторскими свидетельствами и патентами. Например, гранулы фуразолидона для приготовления суспензии для питья имеют в 2 раза более высокую биодоступность, во столько же раз снижена их доза на прием, что уменьшает побочный эффект и на 50 % сокращает расход субстанции. В гранулах фурадонина для приготовления суспензии для питья впервые полностью устранен мутагенный эффект. Гранулы кальмагина для приготовления суспензии для питья — комбинированное средство из натуральных антацидов быстрого и замедленного действия — по эффективности и безвредности превосходят викалин и альмагель.

9. Впервые в Советском Союзе начаты исследования по созданию активных и нетоксичных растительных препаратов, снижающих уровень азотистых веществ в крови. Изучен гипоазотемический эффект целого ряда суммарных и индивидуальных флавоноидных веществ. Установлена определенная

зависимость между химическим строением и гипоазотемическим действием в ряду изученных соединений. Создан и внедрен на Тбилиском ХФЗ препарат «Фларонид». Исследованы фармакологические свойства двух флавоноидных препаратов. При изучении механизма их действия выявлен новый, ранее не описанный в литературе спектр биологического действия флавоноидов — положительное влияние на катаболические/анаболические процессы. Создан препарат «Флаванобол».

Впервые в СССР налажены экспериментальные исследования комбинированных растительных препаратов для лечения и профилактики почечно-каменной болезни. Изучен комбинированный препарат на основе растительных веществ для лечения и профилактики фосфатного и оксалатного нефроуролитиаза (препарат «Марелин» внедрен на ОЗ ВНИИХТАС).

Аналитические исследования по хроматографии в тонком слое, ГЖХ, спектрофотометрии в видимой, УФ- и ИК-областях спектра, флуориметрии, комплексонометрии, титрованию в неводных растворителях послужили основой для создания более 80 ФС, 14 общих статей для ГФ X и XI изданий, а также концепции аналитического обеспечения технологических исследований.

### ***VII. ГНЦЛС — основной разработчик лекарственных средств в независимой Украине***

В 1991 году институт переименован в Государственный научный центр лекарственных средств (ГНЦЛС).

14 мая 1993 года было принято Постановление № 132 Президиума АН Украины «О направлениях научной деятельности Государственного научного центра лекарственных средств (ГНЦЛС) МЗ и АН Украины», где отмечалось, что в ГНЦЛС накоплен значительный опыт по созданию фитохимических и полусинтетических препаратов, вспомогательных химико-фармацевтических веществ, в разработке готовых лекарственных форм.

С учетом двойного подчинения были внесены соответствующие изменения в Устав ГНЦЛС.

В настоящее время Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств» — многопрофильная научно-исследовательская организация, в составе которой 25 научных и научно-вспомогательных подразделений, обеспечиваю-

щих выполнение всего комплекса НИР по созданию лекарственных средств (ЛС) - от поиска до организации выпуска первых промышленных серий.

Украина стала первым из государств СНГ, которое изыскало возможности для финансирования «Комплексной программы по развитию медицинской, ветеринарной и микробиологической промышленности и улучшению обеспечения населения и потребностей животноводства лечебными средствами и медицинской техникой на 1992-96 гг.», что нашло официальное отражение в Постановлении Кабинета Министров Украины от 08.10.92 № 573. Формирование этой программы осуществлялось концерном «Укрмедбиопром» на конкурсных условиях с участием специалистов отраслевой, академической и вузовской науки. В программу вошли разработки ГНЦЛС по 118 препаратам. Из них 51 оригинальный препарат, 7 препаратов — жизненно важные и перспективные для использования в экстремальных ситуациях (медицина катастроф).

В целом за период 1992-1999 гг. на заводах Украины внедрено более 200 препаратов 17 фармакотерапевтических групп (свыше 20 % из них - оригинальные). Наибольшую часть составляют препараты сердечно-сосудистого действия (нитроглицерин, аэрозоль (АО «Стома»); кратал, гранулы (НПЦ «Борщаговский ХФЗ»)), противовоспалительные средства (диклодерм ТТС (ФК «Здоровье»)), препараты для лечения инфекционных болезней (фладекс, мазь (ФК «Здоровье»)) и приблизительно одинаковое количество (по 6-7 в каждой группе) — препараты для гастроэнтерологии (эрикан, гранулы (ОЗ ГНЦЛС)), гепатологии (глутаргин, таблетки, раствор д/ин. (ФК «Здоровье»)), иммунологии, аллергологии (задитен, сироп д/детей (ФК «Здоровье»)), а также содержащие витамины (комплевит, таблетки (АО «Киевский витаминный завод»)).

Осуществлен цикл исследований по созданию и внедрению в производство группы комбинированных анальгетиков-антипиретиков массового потребления на основе парацетамола, в т.ч. взамен препаратов с высокотоксичным фенацетином, а также большой группы разнообразных противовоспалительных средств - ненаркотических анальгетиков. Изучены закономерности фармако- и токсикодинамики, фармакокинетики и биофармацевтических свойств большого числа комбинированных таблетированных препаратов. В

результате разработаны и внедрены в промышленное производство 37 высокоэффективных анальгетиков-антипиретиков (парацетамол, свечи (АО «Монфарм»); индовазин, гель (НПЦ «Борщаговский ХФЗ»)), что позволило полностью удовлетворить потребность здравоохранения Украины в широком ассортименте эффективных и безопасных отечественных лекарственных средств данной группы.

В 1999-2004 гг. внедрено еще 60 препаратов, из которых 15 — оригинальные (сорбцел, гелеобразующая повязка (АО «Лубныфарм»); факовит, таблетки (ФК «Здоровье»); октамин-плюс, таблетки (ФК «Здоровье») и др.).

Впервые в СНГ специалистами научного Центра созданы отечественные технологии получения ретардных ЛФ (нифедипин, таблетки (ЗАО ФФ «Дарница»); аминалон, таблетки (ОАО «Концерн Стирол»)), таблеток с кишечнорастворимым покрытием (панкреатин-ЗТ, таблетки (ФК «Здоровье»); панкреазим, таблетки (ЗАО «Технолог»)), двухслойных таблеток с поддерживающим терапевтическим эффектом (амброксол, таблетки (НПЦ «Борщаговский ХФЗ»)) и разработаны современные методы их анализа. Это способствовало созданию и воспроизводству современных и конкурентоспособных ЛС. Особо следует отметить возможности технологии получения твердых ЛФ с использованием установок для сушки в псевдокипящем слое фирмы «Glatt», Германия. На имеющейся в ГНЦАС опытно-промышленной установке осуществлена экспериментальная отработка большинства необходимых в производстве таблеток технологических операций. Завершение этих исследований позволило более эффективно использовать на заводах отрасли подобные промышленные установки и выйти на европейский уровень аппаратного обеспечения технологического процесса производства таблетированных ЛФ.

Особое значение для производства мягких ЛФ имеют разработанные в ГНЦАС новые гидрофильные основы, способствующие более эффективному действию лекарственных веществ (ЛВ). В ряде случаев использование этих основ позволило не только уменьшить концентрацию ЛВ в ЛФ, но и снизить токсичность и риск развития побочных эффектов. Кроме этого, к преимуществам новых основ относятся технологичность, стабильность и более низкая себестоимость по сравнению с традиционными основами (вазелин, витепсол

и др.). В ряде случаев применение этих основ открыло принципиально новые возможности в терапии различных заболеваний. С использованием новых запатентованных основ разработаны и внедрены в производство технологии получения мазей, суппозиториев, кремов, гелей для хирургии, комбустиологии, проктологии, гинекологии и дерматологии. Многие из этих препаратов, например, мазь «Фладекс», крем бензилбензоата, гель с диклофенаком натрия, Диклоцин-КМП-гель и др. являются импорт-замещающими. Разработанная в Центре технология получения нового вспомогательного вещества — проксанол-268 — позволила найти решения, определяющие перспективные направления в разработке мягких ЛФ, что, в свою очередь, может создать значительный экспортный потенциал.

Центром выполнены работы по созданию 8 наименований ЛФ нового поколения. Среди них следует отметить трансдермальные системы для доставки ЛС резорбтивного действия (например, система, содержащая сердечно-сосудистое средство форидон) и для доставки ЛС непосредственно к месту патологического процесса (например, пластырь для применения у взрослых и детей, содержащий НПВС — ортофен). Создана и передана в производство многокомпонентная система для наружного применения — мазь «Нитацид». Проводятся НИР по созданию ЛФ для взрослых и детей на основе микрокапсул и липосом. В состав этих форм могут быть включены средства различных фармакотерапевтических групп для применения во многих областях медицины.

Экспериментально доказана возможность создания противотуберкулезных препаратов в форме суппозиториев. Разработаны суппозитории с этамбутолом и суппозитории Пирозид-М (АО «Монфарм»), содержащие субстанции изониазида, рифампицина и пиразинамина, которые успешно прошли клинические испытания и рекомендованы к медицинскому применению.

Приоритетной в Украине и странах СНГ является разработанная в ГНЦАС и внедренная в производство технология получения водорастворимых солей синтетических и природных биологически активных соединений с аминокислотами. Спектр фармакологического действия этих препаратов весьма широк. Среди них: гипозотемическое средство (байкамин), детоксикант и актопротектор (аспалонат), средства для отеков (раствор

Доля препаратов, разработанных ГП ГНЦЛС, в номенклатуре основных производителей ЛС в Украине (2004 год)

Предприятие	Номенклатура препаратов		
	всего	из них препараты, разработанные ГП ГНЦЛС	
		Ед.	%
ООО «ФФ «Здоровье»	141	65	46.1
ГП «ОЗ ГНЦЛС»	92	27	29.3
АО «ХФЗ «Красная Звезда»	29	18	19.6
ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ»	119	34	28.6
ОПХФО «Биостимулятор»	45	15	33.3
ЗАО «ФФ «Дарница»	208	44	21.2
АО «Галычфарм»	84	24	28.6
ОАО «Лубныфарм»	82	14	17.1
ХГФП «Здоровье народу»	31	11	35.5
АО «Луганский ХФЗ»	51	7	13.7
ЗАО «Биолек»	60	4	6.7
ОАО «Фармак»	72	5	6.9
ОАО «Монфарм»	51	3	5.9
АО «Киевский витаминный завод»	91	2	2.2
ОАО «Витамины»	60	2	3.3
ОАО «Киевмедпрепарат»	80	12	15.0
ОАО «Днепрофарм»	22	2	9.1
АО «Стома»	20	7	35.0
ОАО «Концерн Стирол»	25	7	28.0
ЗАО «Биофарма»	22	1	4.5
<b>Всего:</b>	<b>1385</b>	<b>304</b>	<b>21.9</b>

Доля отечественных препаратов в емкости рынка ЛС (2004 год)

Фармакотерапевтическая группа	Доля отечественных препаратов в емкости рынка (в стоимостном выражении) ЛС, %	Доля препаратов ГП ГНЦЛС в емкости рынка отечественных ЛС, %
лекарственные средства, действующие преимущественно на центральную нервную систему	1.0	51.4
лекарственные средства, действующие преимущественно на периферические нейромедиаторные процессы	22.6	38.5
лекарственные средства, действующие преимущественно в области чувствительных нервных окончаний	19.4	54.4
средства, действующие на сердечно-сосудистую систему	55.9	13.1
средства, усиливающие выделительную функцию почек	28.8	1.1
гепатотропные средства	13.6	79.3
средства, регулирующие метаболические процессы	42.0	4.4
препараты, корректирующие иммунологические процессы	3.2	-
препараты разных фармакотерапевтических групп	48.6	1.4
противомикробные, противовирусные и противопаразитарные средства	42.3	11.9
препараты для лечения онкологических заболеваний	9.2	-

L-лизина эсцината, эсгефол-гель), гемостимулятор (раствор L-лизина байкалината), обезболивающее и противовоспалительное средство (ацелизин), гепатопротекторное средство (глутаргин), средство для лечения брон-

холегочных заболеваний (гистинат).

Практические результаты одного из научных направлений ГНЦЛС — создания ЛФ для педиатрии - нашли конкретное выражение в совместных работах Центра с ЗАО НПЦ

«Борщаговский ХФЗ», ОАО «ФФ «Здоровье» и ОАО «Лубныфарм». Использование современных технологий и новых вспомогательных веществ позволили разработать жидкие детские ЛФ, отвечающие современным требованиям (не содержат сахара и спирта, удобны для употребления детьми младших возрастных групп, имеют длительный срок годности). Получили разрешение к медицинскому применению в Украине первые отечественные сиропы амброксола, кетотифена, парацетамола, пироксикама, феррум-БО.

Специалистами Центра разработана оригинальная технология получения инъекционных ЛФ на основе микронизированных гетерогенных систем из известных биологически активных субстанций в виде коллоидных растворов, суспензий и эмульсий. Эти системы содержат микросферы размером от сотен ангстрем до нескольких микрометров, что позволяет создавать в организме человека условия для активного транспорта ЛВ через мембраны. Примерами препаратов, полученных по такой технологии, являются суспензия триамцинолона (стабильность которой значительно выше, чем у венгерского аналога) и раствор томерзола д/ин. (получен в соавторстве с разработчиком субстанции - Институтом органической химии НАН Украины).

В Центре разработана также технология перевода твердых ЛВ в микрокристаллическую модификацию, не образующую агрегаты с микросферами, что позволяет повышать стабильность парентеральных суспензий и эмульсий при длительном хранении без нарушения равновесного состояния ЛФ. Примером является созданный по заказу АО «ФФ «Дарница» препарат пролонгированного действия кеторолак-триметамин (кетолонг), который по анальгезирующему эффекту превосходит зарубежный аналог вольтарен.

Перспективным направлением в работе ГП ГНЦЛС является целенаправленный поиск координационных соединений железа (III) и создание на их основе комбинированных железосодержащих препаратов нового поколения, обладающих высокой биодоступностью и низкой токсичностью. В медицинской практике уже широко используется препарат из этой серии «Феррамин-Вита», таблетки (АО «Галичфарм»), разрешен к медицинскому применению препарат «Ферростат», таблетки (АО «Лубныфарм»), на разных этапах исследования находятся препараты «Феррамин-вита», сироп (АО «Галич-

фарм»), «Глютафер», капсулы (ХФЗ «Красная звезда»), «Комплафер», капсулы (НПЦ «Борщаговский ХФЗ»).

В настоящее время активно ведутся работы по созданию препаратов на основе растворимых солей кальция для лечения остеопороза, которые являются высокоэффективными и безопасными. Препарат «Кальций D<sub>3</sub> цитрат», таблетки (АО «Галичфарм») разрешен к медицинскому применению, препарат «Кальций-остеовит», капсулы, завершает II фазу клинических испытаний (ХФЗ «Красная звезда»).

Таким образом, в настоящее время ГП ГНЦЛС является обладателем ряда современных технологий получения конкурентоспособных ЛС в наиболее распространенных ЛФ.

Приоритетным также является направление по созданию ферментных препаратов на основе панкреатина и микробиологических субстанций. Совместные исследования, проведенные специалистами Центра и заводов (ОАО «Витамины», ЗАО «Технолог»), позволили разработать отечественные лекарственные средства: Панкреатин, таблетки для детей (ОАО «Витамины», Умань), Панкреазим (ЗАО «Технолог»), Панкреатин-3Т (ФК «Здоровье»), Дарвистал (ЗАО ФФ «Дарница»), стандартизированные по активности в соответствии с европейскими требованиями. Фармакологическими исследованиями, проведенными в Центре, доказана эффективность, биодоступность лекформы нового поколения — кишечнорастворимых микрогранул в капсулах, разработанных ЗАО «Технолог» (Умань), препарата Креазим 10000 и 20000 (импортного аналога Креона-10000 (Германия)).

Результатом реализации этих технологий на современном технологическом оборудовании стал ряд уже выпускающихся и готовящихся к промышленному выпуску препаратов.

ГП ГНЦЛС сегодня способен на основе одной субстанции разрабатывать до 8 различных ЛФ, соответствующих европейскому уровню.

За последние 4 года доля препаратов в различных ЛФ разработанных ГП ГНЦЛС, составляет в среднем 20 % от общего количества ЛС, освоенных предприятиями Украины (около 40 млн. долларов США в год). Показательно, что заводы, стратегия развития которых отдает приоритет разработкам ГП ГНЦЛС, являются лидерами отрасли по

новой номенклатуре ЛС, объемам их выпуска и реализации. Прежде всего, это ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ», ФФ «Дарница» и ООО «ФК «Здоровье», ОАО «Фармак», фирма «Стиролбиофарм» ОАО «Концерн Стирол», ОАО «Киевмедпрепарат».

К великому сожалению, «Комплексная программа развития медицинской промышленности Украины на 1997-2003 гг.», утвержденная Постановлением Кабинета Министров Украины от 16.12.96, № 1538, не нашла продолжения, а в стратегии развития МЗ Украины не предусмотрено создание отечественных препаратов.

Исходя из этого, стратегия развития ГП ГНЦЛС предполагает насыщение фармацевтического рынка Украины за счет увеличения объемов производства пользующихся спросом отечественных ЛС и производящихся в Украине препаратов-генериков, а также постепенного вытеснения импортируемых препаратов путем создания и внедрения генериков последних поколений и отечественных оригинальных конкурентоспособных ЛС (прежде всего в соответствии с перечнями жизненно необходимых препаратов и препаратов для стандартных методов лечения диабета, туберкулеза, бронхиальной астмы, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, расстройств нервной системы, препаратов для педиатрии).

Препараты, разработанные ГП ГНЦЛС или совместно с предприятиями Украины, являются конкурентоспособными и защищены 494 охраняемыми документами Украины и России (только в 2000-2005 гг. получен 121 патент Украины).

Многие годы ГП ГНЦЛС выполняет функции головной организации по координации работ в области создания технологий и стандартизации, сертификации и метрологии ЛС, охраны труда, техники безопасности и промышленной санитарии. В последние годы разработан пакет отраслевых нормативных документов, которые определяют дальнейшее развитие отрасли.

Разработаны и введены в действие отраслевые стандарты — ОСТ 42У-1-92 и ОСТ 42У-2-92, касающиеся разработки и экспертизы нормативной аналитической и технологической документации.

Учитывая более чем 70-летний опыт ГП ГНЦЛС по созданию Фармакопей СССР с VII по XI изданий, а также наличие высококвалифицированных кадров в вопросах стандартизации и контроля качества лекарствен-

ных средств, Министерством здравоохранения Украины было принято решение создать на базе ГНЦЛС Фармакопейный комитет — высший научно-экспертный орган по разработке нормативных документов и экспертизе АНД (приказ Министра здравоохранения Украины № 50 от 19 марта 1992 года).

Специалистами Фармакопейного центра при участии ГНЦЛС выполнено распоряжение Премьер-министра Украины В.А. Ющенко № 26402/23 от 05.05.2000 и создана Государственная Фармакопея Украины, полностью гармонизированная с Европейской Фармакопеей. Это дало возможность фармацевтическому сектору Украины первому среди других отраслей сделать шаг к интеграции в Европейский Союз. В 2004 году введено в действие Дополнение 1 к Государственной Фармакопее Украины 1-го издания.

Подготовлены и изданы МУ 64У-1-97 «Производство лекарственных средств. Надлежащие правила и контроль качества» и учебное пособие «Надлежащая производственная практика лекарственных средств» (под редакцией проф. В.П. Георгиевского, проф. Н.А. Ляпунова, проф. В.А. Загория, к.фарм.н. Е.П. Безуглой), где собраны переведенные на русский язык руководства ВОЗ, ЕС, PIC-PIC/S по надлежащей производственной практике (GMP) лекарственных средств, стандарты EN серии 45000, основные Директивы Совета ЕС и Комиссии ЕС, а также другие документы, относящиеся к обеспечению качества лекарств (производству, контролю, инспектированию, лицензированию) и сертификации.

Разработан ряд документов для ГСТУ «Государственная система стандартизации фармацевтической продукции», целью создания которого является установление общих принципов и рекомендаций к разработке и производству ЛС в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики (GMP), международных норм по регистрации ЛС, которые приняты Международной Конференцией по гармонизации технических требований к регистрации ЛС для человека (ICH) и ЕС, а также современных международных стандартов по разным аспектам производства стерильной продукции в чистых зонах, которые приняты Международной организацией по стандартизации (ISO).

Разработаны следующие документы:  
— Руководство «Лекарственные средства. Руководство по качеству. Фармацевтическая разработка».

- Руководство «Лекарственные средства. Руководство по качеству. Производство готовых лекарственных средств».
- Руководство «Лекарственные средства. Руководство по качеству. Валидация технологических процессов».
- Руководство «Лекарственные средства. Руководство по качеству. Вспомогательные вещества».
- Руководство «Лекарственные средства. Руководство по качеству. Спецификации и контрольные испытания готовой продукции».
- Руководство «Лекарственные средства. Руководство по качеству. Испытание стабильности».
- Руководство «Лекарственные средства. Руководство по качеству «Чистые помещения и связанные с ними среды, которые контролируются. Часть 1. Классификация чистоты воздуха».
- Руководство «Лекарственные средства. Руководство по качеству «Чистые помещения и связанные с ними среды, которые контролируются. Часть 2. Спецификации по испытанию и мониторингу с целью подтверждения стабильного соответствия руководству ISO 14644-1».
- Руководство «Лекарственные средства. Руководство по качеству «Производство фармацевтической продукции в асептических условиях. Часть 1. Общие требования».
- Руководство «Лекарственные средства. Руководство по качеству «Стерилизация медицинской продукции. Требования к валидации и текущему контролю. Промышленная стерилизация влажным паром».

ГНЦЛС с 1994 года является базовой отраслевой организацией в сфере охраны труда и окружающей среды. В связи с этим лабораторией охраны труда осуществлены следующие мероприятия.

1. Разработаны и пересмотрены в соответствии с международными стандартами отраслевые и межотраслевые нормативные акты по охране труда и экологии (всего 18 нормативных актов):

- правила пожарной безопасности для предприятий по производству лекарственных средств;
- информационные материалы по санитарно — гигиеническим нормативам вредных веществ;

- издан сборник методик выполнения измерений концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе населенных мест;
- 54 типовые отраслевые инструкции по охране труда;
- отраслевые стандарты (ГСТУ 64-8-2000 «Общие технические требования», ГСТУ 64-9-2000 «Виды и комплектность», ГСТУ 64-10-2000 «Материалы текстильные. Номенклатура показателей качества»);
- методические рекомендации (пособия) по разработке планов локализации и ликвидации аварийных ситуаций и индентификации объектов повышенной опасности;
- методические рекомендации «Система управления охраной труда на фармацевтических предприятиях. Общие руководящие указания по принципам управления, системам и средствам обеспечения».

2. Создан банк данных по пожаровзрывоопасности 4700 веществ и санитарно-гигиеническим нормативам для 6000 вредных веществ и материалов в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе, в воде водоемов хозяйственно-бытового и рыбохозяйственного назначения.

3. Проведены комплексные исследования показателей пожаровзрывоопасности 2640 веществ и материалов, применяемых в производстве готовых лекарственных средств в соответствии с ГОСТ 12.1.044 «ССБТ. Пожаровзрывоопасность веществ и материалов. Номенклатура показателей и методы их определения». Создан программно-аппаратурный комплекс для получения и обработки данных на установке по определению показателей пожароопасности твердых веществ «Универсал». Компьютерная обработка позволила значительно повысить точность полученных данных, значительно уменьшить время обработки по сравнению с методами, основанными на записи показателей на фотобумаге с последующей обработкой вручную.

ГП ГНЦЛС традиционно проводит большую работу по подготовке кадров высшей квалификации в области фармации.

ГП ГНЦЛС является центром подготовки специалистов высшей квалификации, которые приглашены на руководящие посты в Государственную службу лекарственных средств и изделий медицинского назначения — Подпрудников Ю.В., Шакина Т.Н., Никитюк В.Г., Государственный фармакологический центр — Антипова О.Е.



На ведущих фармацевтических предприятиях Украины работают Штейнгарт М.В., Асмолова Н.Н., Скакун Н.Н. и др., в отечественных научно-исследовательских институтах руководителями направлений стали Гвоздяк П.И., Чмиль В.Д., аналитические лаборатории возглавили Шовковский А.В., Шкляев С.А., организаторами новых кафедр и их руководителями в Киевских вузах являются Максютин Н.П., Борзунов Е.Е., в Харьковских вузах — Пименов А.Ф., Бондарь В.С. и др.

Как показал краткий исторический очерк, становление ГНЦЛС имеет глубокие научные корни, заложенные в середине 30-х годов.

Основным девизом основоположников института в 30-е годы был лозунг: «От биологически активной субстанции — к лекарственной форме и внедрению ее в производство». Этот девиз, прошедший через все вехи развития, для ГП ГНЦЛС остается актуальным и в настоящее время.

- В Центре созданы ведущие научные школы:
- по изучению растительного сырья, выделению биологически активных веществ и технологии фитохимических производств;
  - химической технологии биологически активных и вспомогательных веществ;
  - созданию оптимальной технологии готовых лекарственных форм;
  - фармакологии;
  - анализу и стандартизации;
  - маркетинговому исследованию рынка лекарств;

— экологии и технике безопасности производств.

Основатели института имеют достойных преемников в развитии перечисленных выше научных школ в лице: Литвиненко В.И., Дихтярева С.И., Новика И.И., Шеина А.Т., Ляпунова Н.А., Казаринова Н.А., Штейнгарта М.В., Алмакаевой Л.Г., Андриюковой Л.Н., Козловой Н.Г., Губиной Т.Н., Масловой Н.Ф., Чайки Л.А., Либиной В.В., Никитиной Н.С., Жемеровой Е.Г., Гризодуба А.И., Хованской Н.П., Рыбаченко А.И., Зинченко А.А., Куликова А.Ю., Георгиевского Г.В., Безуглой Е.П., Пивень Е.П., Каравановой Л.В.

Объединение фундаментальных и прикладных исследований по химии и технологии биологически активных и вспомогательных веществ, фармакологических исследований по выявлению фармакологических эффектов, зависящих от строения биологически активных веществ, биофармацевтических исследований и аналитического сопровождения перспективных направлений явилось экспериментально-практической базой научного обоснования состава готовых лекарственных средств. В этом, прежде всего, и заключается уникальность и научно-практическая значимость ГП ГНЦЛС в развитии фармацевтической науки и фармацевтической индустрии Украины.

О качестве создаваемых Центром лекарственных средств говорит не только их количество, но и сроки применения препаратов ГНЦЛС в лечебной практике.

**Подготовка специалистов высшей квалификации в Специализированном совете при ГП ГНЦЛС**

Количество подготовленных специалистов на 01.01.2005				
		Докторов наук	Кандидатов наук	Всего
		65	215	280
по научным направлениям	фармацевтический анализ	18	36	54
	синтез биологически активных веществ	29	90	119
	фитохимия	17	60	77
	стандартизация и организация производства лекарственных средств	1	29	30
по организациям и предприятиям Украины	ГП ГНЦЛС	15	56	71
	Национальный фармацевтический университет	13	74	87
	Запорожский медицинский университет	10	15	25
	Львовский медицинский университет	2	3	5
	прочие	8	15	23
по странам	Украина	46	163	209
	Россия	9	26	35
	другие страны СНГ	5	15	20
	страны Балтии	3	2	5
	другие страны мира	—	11	11

Заводами Украины и ближнего зарубежья освоены и выпускаются на протяжении многих десятилетий лекарственные средства, разработанные ГП ГНЦЛС.

*Фитохимические препараты:*

- сердечно-сосудистые средства: кордигит (1934 г.), конваллятоксин (1937 г.), строфантин (1937 г.), адонизид (1937 г.), раунатин (1955 г.);
- противоязвенные средства: ликвиритон (1961 г.), плантаглоцид (1964 г.), флакартин (1970 г.);
- желчегонное средство фламин (1960 г.);
- средства, стимулирующие мускулатуру матки: эрготал, эргометрина малеат (1939 г.);
- средство, усиливающее выделительную функцию почек ависан;
- спазмолитическое средство келлин;
- муколитическое средство мукалтин (1970 г.);
- полиферментный препарат ораза (1971 г.).

*Синтетические лекарственные средства:*

- на основе реакций в твердой фазе: фталазол (1955 г.);
- полученные окислением хлорвинила: норсульфазол (1955 г.), циминаль (1970 г.);
- слабительное лекарственное средство изофенин (1940 г.);
- кровоостанавливающий препарат окисленная целлюлоза (1980 г.).

*Вспомогательные вещества.*

- нипагин и нипазол (1937 г.);
- карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза (1965 г.), полиэтиленоксида (1964 г.), твин-80 (1966).

*Новые лекарственные формы.*

- таблетки, растворимые в кишечнике: глутаминовая кислота (1971 г.), пасс-натрия;
- медицинские аэрозоли: ингалипт, каметон, камфомен, ливиан (1970 г.).

*Новые технологии.*

- технология получения кофеина (1938 г., Бакинский ХФЗ);
- технологии получения алкалоидов мака, скопомина, солянки Рихтера (1958-1970 гг., Чимкентский ХФЗ),
- технология получения танина из турецких орешков и скумпии (1964-1967 гг., Тбилисский ХФЗ).

В настоящее время фармацевтический рынок Украины завоевывают новые оригинальные фитохимические препараты, разработанные в Центре за последние 5 лет: три-

валумен, капсулы (ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ»); седавит, раствор д/питья (АО «Галичфарм»); артишок-Здоровье, капсулы (ООО «ФК «Здоровье») и др.

Благодаря усилиям специалистов Центра, разрабатывающим современные наукоемкие технологии, фармацевтический рынок представлен многообразием отечественных лекарственных форм (около 100): от обычных, пролонгированных таблеток — до сложных двухслойных таблеток с поддерживающим терапевтическим эффектом, кишечнорастворимых микрогранул, заключенных в капсулы, трансдермальных терапевтических систем, глазных, инъекционных, мягких и детских лекформ (сиропы, гранулы для растворения и др.) и многих других лекарственных форм.

Препараты-генерики нового поколения, разработанные в Центре, сегодня лидируют по уровню продаж, степени популярности и вытесняют импортные аналоги (омепразол, капсулы (АО «Киевмедпрепарат»); альмагал, табл., суспензия (АО «Галичфарм»); виснол, капсулы («ОАО «Фармак»); панкреатинсодержащие препараты (панкреатин-ЗТ, таблетки (ООО «ФК «Здоровье»); панкреазим, табл. (ЗАО «Технолог») и др.).

*Следует еще раз выделить пионерские работы, признанные в мировой фармацевтической и химической науке:*

- биологическая стандартизация сердечных гликозидов — 1928 г.;
- открытие принципа хроматографии в тонких слоях сорбентов — 1938 г.;
- методологические подходы к разработке метода «ускоренного старения» для определения срока годности лекарственных средств — 1944 г.;
- теоретические вопросы кислотно-основного титрования в неводных растворителях — 1954 г.;
- обнаружение нового явления в органической химии — хромоизомеризации — 1947 г.;
- открытие возможности осуществления реакций между органическими растворителями в твердой фазе — 1949 г.;
- обосновано обобщение линейного уравнения, описывающего динамику адсорбции и десорбции в условиях, обеспечивающих оптимальное проведение этих процессов как составных частей адсорбционного метода выделения веществ из растворов — 1965-1975 гг.;
- выделение и установление строения природных соединений с установлением ряда

- закономерностей, относящихся к вопросу: строение — биологическая активность;
- установление обратной зависимости между величиной биологической активности и конформационной и термодинамической стабильностью соединений;
- установлено существование аномальной гликозидной связи при наличии тяжелых объемных агликонов;
- обнаружены так называемые разделяемые конформеры — 1985 г.;
- установлены возможности химической трансформации природных соединений (кардиостероидов, алкалоидов, флавоноидов) с целью улучшения их фармакотерапевтических свойств — 1990-2000 гг.;
- открыта способность производных 5,6,7-тригидроксифлавона избирательно ингибировать липоксигеназный путь окисления арахидоновой кислоты, послужившая основой для создания нового поколения лекарственных препаратов — производных флавоноидов и аминокислот — 1989-2000 гг.;
- развиты теоретические работы по исследованию вспомогательных веществ, активности и биодоступности лекарственных средств, по комплексному изучению механизмов и закономерностей физико-химического, фармакокинетического, фармако- и токсикодинамического взаимодействия веществ при комбинированном применении в твердых, мягких и инъекционных лекарственных формах — 2000-2005 гг..

Следует подчеркнуть, что в ГП ГНЦЛС на основе действующих законодательных и нормативных актов создана и функционирует гибкая система, включающая весь комплекс необходимых исследований по разработке оригинальных ЛС и препаратов-генериков (практически всех фармакотерапевтических групп), субстанций и вспомогательных веществ. При наличии финансирования специалисты ГП ГНЦЛС способны ежегодно разрабатывать и внедрять в производство 2-3 оригинальных ЛС и свыше 40 препаратов-генериков. Результаты разработок могут существенно повысить конкурентоспособность продукции и экономическую стабильность отечественной фармацевтической промышленности, ликвидировать дефицит наиболее важных препаратов по основным фармакотерапевтическим группам.

Свое будущее коллектив ГП ГНЦЛС связывает с созданием новых лекарственных

средств, с дальнейшим развитием отечественной фармацевтической промышленности, в частности, её переходом на работу по правилам GMP, осуществлением гармонизации с другими европейскими нормами и стандартами (GLP, GSP и др.), с увеличением объемов продукции и расширением рынков сбыта на страны СНГ, Восточной и Западной Европы.

Развивая в течение 85 лет стратегические направления своей деятельности, на современном этапе ГП ГНЦЛС продолжает оставаться уникальным, единственным в Украине центром фундаментальной и прикладной фармацевтической науки, способным осуществлять комплексные исследования в фармацевтической отрасли, начиная от разработки субстанции, заканчивая внедрением в производство всех возможных лекарственных форм из нее, включая оформление необходимой нормативной документации.

Особенно востребованным наш потенциал может оказаться в условиях реальной интеграции Украины в Европейский Союз. Фармацевтический сектор экономики Украины *должен* опираться на огромный научный и производственный опыт, накопленный в ГП ГНЦЛС за 85 лет его славной истории. *Мы можем осуществлять разработки на европейском уровне.* Для этого необходима воля и финансовая поддержка как со стороны государственных органов, так и со стороны производителей лекарственных препаратов, ведь современные научные разработки — гарантия стабильного развития фармацевтической отрасли.

В соответствии с Программой Правительства Народного доверия Украины, трудоспособное, конкурентоспособное предприятие должно получить толчок к своему развитию. Этот в полной мере относится к ГП ГНЦЛС, научные достижения которого при поддержке правительства позволят сохранить здоровье нации, обеспечив народ Украины и его армию отечественными лекарственными средствами, фармацевтическому сектору интегрироваться в Европейский Союз, а значит ГП ГНЦЛС может внести свой вклад в выполнение разделов «Безопасность» и «Мир» Программы Правительства.

Украинский народ должен иметь эффективные, конкурентоспособные, доступные по цене отечественные препараты. Это и есть та цель, реализации которой посвящена вся 85-летняя деятельность ГП ГНЦЛС.

## До запровадження Державної Фармакопеї України

УДК 615.074:543.452

Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Архипова Н.Н.,  
Зволинская Н.Н., Овчинникова Т.И., Денисенко Н.В.  
Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»  
Государственная инспекция по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины

### Аттестация тестовых образцов раствора глюкозы 5 % для инфузий для количественного определения глюкозы методом рефрактометрии

Впервые проведена аттестация двух промышленных серий раствора глюкозы 5 % для инфузий в контейнерах ПВХ, использованных в качестве тестовых образцов в 4 раунде Программы профессионального тестирования лабораторий «Фарма-Тест» в системе Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины. Фармакопейный метод рефрактометрического определения раствора глюкозы 5 % на имеющихся в большинстве лабораторий и аптек Украины приборах ИРФ-22 обладает значительной неопределенностью (около 4 %) и является корректным только при допусках содержания  $\pm 15\%$  от номинального значения, а не  $\pm 3\%$ , как принято в действующих АНД. Данные АНД нуждаются в пересмотре с целью или адекватного расширения допусков содержания глюкозы, или замены метода. В качестве альтернативного метода может быть использован, в частности, метод высушивания (в том случае, когда нет других компонентов, кроме глюкозы).

Использование промышленных серий готовых лекарственных средств (ГЛС) в качестве тестовых образцов (ТО) для программ профессионального тестирования лабораторий контроля качества лекарственных средств (ППТ) имеет существенные преимущества по сравнению с модельными смесями, поскольку позволяет оценить уровень работы этих лабораторий с реальными лекарственными препаратами, сократить время и средства на приготовление, выбор упаковки, аттестацию, реактивы и материалы [1]. Ранее [1] нами были рассмотрены вопросы аттестации промышленных серий таблеток (самой распространенной лекарственной формы) кальция глюконата в качестве ТО для количественного титриметрического анализа. Представляет интерес использование в качестве ТО второй по значимости лекарственной формы – промышленных серий инъекционных препаратов.

Ранее нами были рассмотрены вопросы аттестации ТО для ППТ для количественного определения лекарственных средств (ЛС) методами титриметрии [1], спектрофотометрии [2] и жидкостной хроматографии [3]. Кроме того, представляет интерес изучение вопросов аттестации ТО для количественного определения ЛС методом рефрактометрии. Данный метод отличается простотой исполнения и аппаратного оформления и, в силу этого, широко применяется, в т.ч. для внутриаптечного анализа. Описан он также и в качестве фармакопейного метода анализа ЛС [4]. Самым распространенным ГЛС, для количественного определения которого при-

меняется рефрактометрия, являются 5-40 % растворы глюкозы для инъекций [5].

Как было показано ранее [1-3], аттестация ТО обязательно требует предварительного исследования метрологических характеристик аттестуемой методики анализа. В то же время, несмотря на широкое распространение растворов глюкозы для инфузий, исследование метрологических характеристик используемого для количественного определения глюкозы метода рефрактометрии ранее не проводилось.

Целью данной работы является исследование метрологических характеристик количественного определения глюкозы методом рефрактометрии и аттестация промышленных серий раствора глюкозы 5 % для инфузий в контейнерах ПВХ в качестве ТО для программы ППТ.

Работа проводилась в рамках подготовки 4 раунда Программы профессионального тестирования лабораторий «Фарма-Тест» в системе Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины.

Если нет особых указаний, далее используются односторонние доверительные интервалы для вероятности 95 %.

#### 1. Теоретическая часть

В соответствии с требованиями ГФУ [4], для количественного определения выбирают область концентраций, в которых выполняется линейная зависимость показателя преломления от концентрации исследуемого вещества, и рассчитывают концентрацию этого

вещества в абсолютных процентах по формуле:

$$X_{abs} \% = \frac{n - n_o}{F}, \quad (1)$$

где:

$n$  — показатель преломления исследуемого вещества,  
 $n_o$  — показатель преломления растворителя,  
 $F$  — фактор, равный приросту показателя преломления при изменении концентрации на 1 %.

В нашем случае (анализ глюкозы в водном растворе)  $n_o = 1.3330$  [4, 5],  $F = 0.00142$  [5], и формула (1) имеет вид [5]:

$$X_{abs} \% = \frac{n - 1.3330}{0.00142}. \quad (2)$$

*Схема измерений.* Процесс измерения показателя преломления состоит в предварительной калибровке прибора по эталонным жидкостям в соответствии с требованиями ГФУ [4] с последующим измерением показателя преломления образца.

### 1.1. Неопределенность количественного определения методом рефрактометрии

Из соотношения (1) видно, что величина  $X_{abs}$  является функцией 3 случайных переменных —  $n$  (измерение образца),  $n_o$  (калибровка прибора),  $F$  (установление расчетного фактора). Величина  $F = 0.00142$  [5] одинакова на стадии аттестации тестовых образцов и стадии их анализа участниками, поэтому не сказывается на отличии результатов, полученных участниками ППТ, от приписного значения. Следует также отметить, что данная величина является для глюкозы справочной (т.е., фактически, генеральной). В силу этого, неопределенность, связанная с величиной  $F$ , далее рассматриваться не будет.

Неопределенность величин  $n$  и  $n_o$  связана как непосредственно с самим процессом измерением показателей преломления ( $\Delta n_m$ ), так и с температурным фактором ( $\Delta n_t$ ) — отличием температуры измерений от номинальной (20.0 °C). В соответствии с изложенной выше *Схемой измерений*, калибровка рефрактометра и измерение показателей преломления образца проводится параллельно при термостатировании, т.е. при одинаковой температуре. Поэтому в полученном показателе преломления мы имеем только одну составляющую, связанную с температурным фактором. В итоге, суммарная неопределенность показателя преломления образца ( $\Delta n_{tot}$ )

равна [6]:

$$(\Delta n_{tot})^2 = (\Delta n_t)^2 + 2 \cdot (\Delta n_m)^2 \quad (3)$$

В соответствии с ГФУ [4], величина  $\Delta n_m$  не должна превышать  $2 \cdot 10^{-4}$ . В ГФУ даются значения температурного коэффициента  $\Delta n / \Delta t$ , которые равны изменению показателя преломления при изменении температуры на 1 °C. В соответствии с требованиями ГФУ [4], температура измерений должна быть в пределах  $(20 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , поэтому

$$\Delta n_t = 0.5 \cdot (\Delta n / \Delta t). \quad (4)$$

Соответственно, полная абсолютная неопределенность количественного определения глюкозы (как и любого другого вещества) равна:

$$\begin{aligned} \Delta_{As} abs \% &\leq \frac{\Delta n_m}{F} = \frac{\Delta n_m}{0.00142} = \\ &= 0.0704 \cdot (10^4 \cdot \Delta n_m) \end{aligned} \quad (5)$$

Если номинальная концентрация равна  $X_{nom}$ , относительная неопределенность равна:

$$\Delta_{As} \% \leq \frac{100 \cdot \Delta_{As} abs \%}{X_{nom}} = \frac{7.04 \cdot (10^4 \cdot \Delta n_m)}{X_{nom}} \quad (6)$$

Как было показано [7], между относительной неопределенностью методики количественного определения  $\Delta_{As}$  и относительными допусками содержания анализируемого вещества в ГЛС ( $B\%$ ) существует соотношение [8]:

$$\Delta_{As} \% \leq 0.32 \cdot B \quad (7)$$

В частности, допуски содержания 3.0 % (требования АНД [5]) соответствуют  $\Delta_{As} = 1.0\%$ .

При известном значении  $\Delta_{As}$  из соотношения (7) можно найти соответствующие ему допуски содержания  $B$ :

$$B \% \geq 3.12 \cdot \Delta_{As} \% \quad (8)$$

Результаты расчетов величин  $\Delta_{As}$  для различных  $\Delta n_m$ ,  $\Delta_{As}$  и  $B$  по уравнениям (3-8) представлены в Табл. 1.

### 1.2. Допуски содержания глюкозы

Из Табл. 1 видно, что температурная составляющая неопределенности показателя преломления ( $\Delta n_t$ ) для органических эталонных жидкостей (триметилпентан, толуол и метилнафталин) в 6 раз больше, чем для воды, и существенно завывает, по сравнению с водой, полную неопределенность показателя преломления ( $\Delta n_{tot}$ ). Отметим, что именно эти органические растворители регламентирует европейская часть общей статьи ГФУ [4] для

Таблица 1

Прогноз точности количественного определения водных растворов глюкозы методом рефрактометрии

Калибровка по эталонной жидкости	$\Delta n_m \cdot 10^4$	$\Delta n_r \cdot 10^4$	$\Delta n_{tot} \cdot 10^4$	$\Delta A_s \text{ abs\%}$	Предельные величины $\Delta A_s\%$ и $B\%$ (в скобках) для концентраций глюкозы, равной			
					5 %	10 %	20 %	40 %
триметилпентан	2.0	2.45	3.74	0.26	5.3 (16.5)	2.6 (8.2)	1.3 (4.1)	0.66 (2.1)
толуол	2.0	2.8	3.98	0.28	5.6 (17.5)	2.8 (8.8)	1.4 (4.4)	0.70 (2.2)
метилнафталин	2.0	2.4	3.71	0.26	5.2 (16.3)	2.6 (8.2)	1.3 (4.1)	0.65 (2.1)
вода	2.0	0.425	2.86	0.20	4.0 (12.6)	2.0 (6.3)	1.0 (3.2)	0.50 (1.6)
требования АНД [4]:								
ФС 42У-12-568-99					0.96* (3.0)	-	-	-
ФС 42У-105-900-00					0.96* (3.0)	1.6* (5.0)	-	-
ФС 42У-138-1270-01					0.96* (3.0)	0.96* (3.0)	0.96* (3.0)	0.96* (3.0)
ФС 42У-305-1141-01					0.96* (3.0)	1.6* (5.0)	-	-

Примечание.

\* рассчитано по уравнениям (7-8)

калибровки рефрактометра. Поэтому использование вместо них при рефрактометрии водных растворов калибровки по воде, как рекомендует национальная часть общей статьи ГФУ [4], представляется очень целесообразным.

Следует также отметить очень большую неопределенность анализа  $\Delta A_s\%$  при концентрациях глюкозы 5 %, которая позволяет использовать рефрактометрию лишь при допусках отклонения содержания от номинального значения более 10 % (из Табл. 1 — 12.6 %). Поэтому допуски отклонения содержания глюкозы по АНД ( $B = 3\%$ ) являются совершенно некорректными и ни в коей мере не позволяют контролировать качество раствора глюкозы 5 % методом рефрактометрии. Допуски  $B = 3\%$  являются корректными для всех способов калибровки лишь для концентрации глюкозы 40 %. Для концентрации глюкозы 20 % корректно будет  $B = 5\%$ , 10 % - 7.5 %, а для 5 % - 15 %. Примерно такие же допуски будут корректными для количественного определения и других веществ методом рефрактометрии.

### 1.3. Требования к результатам участников ППТ

Отклонение результатов участников ППТ от аттестованного значения ( $bias$ ) не должно превышать максимально допустимую неопределенность анализа [1-3]. Максимально допустимая неопределенность анализа ( $max\Delta A_s$ ) связана с допусками содержания определяемого вещества в готовом лекарственном средстве соотношением (7), которое и используется для установления требований к

результатам участников ППТ. Однако в нашем случае, как видно из Табл. 1, допуски содержания глюкозы в растворе глюкозы 5 % ( $B = 3\%$ ) в 4 раза меньше допусков ( $B = 12.6\%$ ), отвечающих максимально допустимой точности анализа ( $max\Delta A_s = 4.0\%$ ). Поэтому для установления требований к  $bias$  необходимо взять эту максимально допустимую точность анализа, т.е.:

$$bias \leq \max \Delta A_s \% = 4.0 \% \quad (9)$$

Неопределенность аттестованного значения должна быть незначима по сравнению с максимально допустимым отклонением от приписного значения, т.е. [2]:

$$\Delta_{Att} (\%) \leq 0.32 \cdot bias = 1.3\% \quad (10)$$

В том случае, когда требование (10) не выполняется, соотношение (9) также не выполняется. В частности, различие ( $Dif$ ) двух случайных величин, характеризующихся  $max\Delta A_s = 4.0\%$  каждая, отвечает соотношению [6]:

$$Dif (\%) \leq \sqrt{2} \cdot 4.0 = 5.7\% \quad (11)$$

### 1.4. Установление приписного значения

В том случае, когда для определения приписного значения  $X_{Att}$  используется  $g$  неравноточных выборок, характеризующихся выборочными средними  $\bar{x}_k$  и неопределенностями  $\Delta_{\bar{x},k}$ , его рассчитывают по формуле взвешенного среднего [6]:

$$X_{Att} = \bar{x} = \frac{\sum_{k=1}^g (1/\Delta_{\bar{x},k}^2) \cdot \bar{x}_k}{\sum_{k=1}^g (1/\Delta_{\bar{x},k}^2)} \quad (12)$$

Доверительный интервал  $\Delta_{Att}$  этого взвешенного среднего находят из соотношения [6]:

$$\Delta_{Att}^2 = \Delta_x^2 = \frac{1}{\sum_{k=1}^g (1/\Delta_{x,k}^2)} \quad (13)$$

**2. Исследование метрологических характеристик количественного определения глюкозы в растворах методом рефрактометра**

**Аттестуемые образцы:** По 3 контейнера раствора глюкозы 5 % для инфузий в контейнер ПВХ по 250 мл каждой из промышленных серий 731103/1 (производство Луганского ОКПП «Фармация») и 240803 (производство компании «Грамед»).

**Реактивы и титрованные растворы** соответствовали требованиям ГФУ [9]. Для приготовления модельных растворов использовали субстанцию глюкозы (моногидрат) серии QV2061 производства «Cerestar Deutschland GmbH a Cargill Company», Германия, отвечающую требованиям АНД [10].

**Рефрактометры:** Поскольку большая часть лабораторий областных Государственных инспекций и аптек в Украине оснащена рефрактометрами ИРФ-22 («КЗАП», Казань, Россия), наше исследование также проводилось на двух аттестованных рефрактометрах ИРФ-22. Кроме того, для сравнения использовали полуцифровой рефрактометр марки DR-A1 («АТАГО», Япония).

При проведении исследований перед аттестацией тестовых образцов, необходимо было проверить правомерность выводов Табл. 1 и соотношений (9, 11).

**2.1. Калибровка рефрактометра**

Согласно рекомендациям ГФУ [4], рефрактометр и испытуемые растворы термостатировали при температуре  $(20 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , калибровку проводили по воде дистиллированной, принимая ее показатель преломления равным [4]  $n^{20} = 1.3330$ . Результаты калибровки проверяли по воде дистиллированной, измеряя ее четыре раза, вытирая каждый раз прибор и нанося воду снова (Табл. 4).

**2.2. Приготовление модельных растворов**

**2.2.1. Определение содержания воды в глюкозе**

Поскольку глюкоза содержит значительное количество воды (7-9.5 % [10]), перед проведением исследований определяли содержание воды методом Фишера. Результаты приведены в Табл. 2. Расчеты метрологических характеристик проводили в соответствии с требованиями ГФУ [6].

**2.2.2. Приготовление модельных растворов глюкозы**

Готовили растворы глюкозы в воде с концентрациями, которые варьируются в диапазоне (80-120) % (как рекомендует ГФУ [8]) от номинального значения (5 %) в колбах вместимостью 100 мл.

Таблица 2

**Определение содержания воды в субстанции глюкозы методом Фишера**

	Определение титра			Определение воды в субстанции глюкозы		
	навеска воды, мг, $m_{water}$	объем титранта $V_1$	титр, мг/мл $T$	навеска глюкозы, мг, $m_{gl}$	объем титранта $V_2$	содержание воды, %, $X_{water}\%$
требования АНД [10]						7.0-9.5
1.	24.96	5.168	4.830	496.74	9.258	9.04
2.	24.96	5.154	4.843	524.06	9.632	8.92
3.	24.96	5.164	4.834	502.51	9.229	8.91
4.	24.96	5.144	4.852	496.33	9.096	8.89
5.	24.60	5.088	4.906	506.85	9.396	9.00
$\bar{X}$			<b>4.853</b>			<b>8.95</b>
RSD%			0.64			0.73
$\Delta_x$ %			0.79			0.90
$\Delta_x$ %(tot)						1.2
$\Delta_x$ (tot)abs%						0.11
теоретическое (стехиометрическое) содержание воды в глюкозе моногидрате, %*						9.08

Примечание.

\*глюкоза безводная имеет молекулярную массу 180.2 у.е., глюкоза моногидрат – 198.2 у.е. [10].

Поскольку растворы глюкозы, используемые в качестве лекарственных средств, являются 5 % в пересчете на глюкозу безводную [5], концентрацию глюкозы в модельных растворах пересчитывали на безводную. Для этого взятые навески глюкозы умножали на коэффициент пересчета  $(100 - 8.95)/100 = 0.9105$ . Полученные концентрации модельных смесей представлены в Табл. 3.

### 3.3. Проведение измерений показателя преломления

Каждый раствор измеряли 4 раза. Перед каждым измерением рефрактометр вытирали, промывали водой дистиллированной и наносили исследуемый раствор. Перед проведением всех измерений проверяли показатель преломления воды (должен быть 1.3330).

Как видно, показатели преломления очень мало варьируют, что связано со значительным влиянием субъективного фактора на цифровом рефрактометре ИРФ-22. Таким образом, получить характеристики воспроизводимости метода рефрактометрии обычным способом (большим количеством повторных измерений) невозможно. Более объективно эти величины можно получить из остаточного стандартного отклонения линейной зави-

симости величин  $n_i - n_o$  от концентрации глюкозы.

### 2.4. Изучение линейности

Строили линейные зависимости величин  $(n_i - n_o) \cdot 10^4$  ( $Y$ ) модельных растворов из Табл. 4 от концентраций глюкозы ( $X$ ) из Табл. 3, которые обрабатывали методом наименьших квадратов. Результаты представлены на Рисунке. Линейная зависимость  $Y = a + b \cdot X$  характеризовалась следующими метрологическими характеристиками:

$$Y = 5.30 + 13.29 \cdot X, s_a = 2.30, \\ s_b = 0.48, r = 0.99614, s_{rest} = 0.82 \quad (14)$$

Принимая во внимание, что  $t(95\%, 7) = 1.943$  [6], видно, что свободный член ( $a = 5.30$ ) значимо отличается от нуля. В то же время, коэффициент наклона ( $b = 13.29 \cdot 10^4 = 0.001329$ ) незначимо отличается от 0.00142 (значение, которое в АНД используется для расчета концентраций по данным  $n_i - n_o$ ).

### 2.5. Точность

Расчеты найденных концентраций глюкозы в модельных смесях проводили по соотношению (1).

Как видно, несмотря на хорошую (благодаря субъективному фактору) сходимость

Таблица 3

Навески (= процентные концентрации) глюкозы для приготовления модельных растворов

№ раствора	Навеска субстанции глюкозы моногидрата, $m_{sub}$ , г	Пересчет на глюкозу безводную, г	Концентрация глюкозы в модельных растворах, % (м/о)
1.	6.33083	5.76422	5.76422
2.	6.04116	5.50048	5.50048
3.	5.79879	5.27979	5.27979
4.	5.54367	5.04751	5.04751
5.	5.31919	4.84312	4.84312
6.	5.03969	4.58864	4.58864
7.	4.79714	4.36779	4.36779
8.	4.54544	4.13863	4.13863

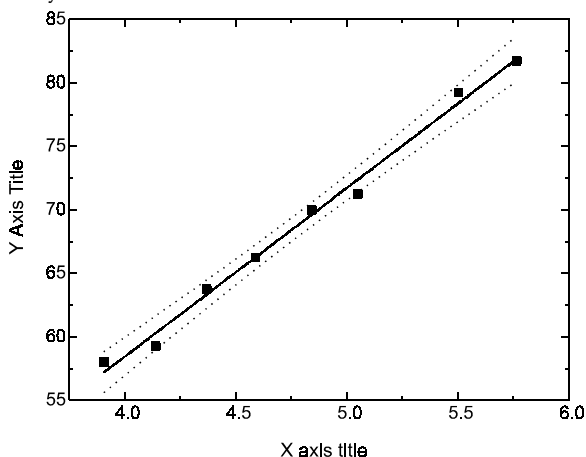
Таблица 4

Результаты определения показателя преломление в модельных растворах

Вода $n_o$	Номер раствора ( $n_i$ )							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	показатель преломления							
1.3330	1.3411	1.3410	1.3401	1.3400	1.3395	1.3395	1.3390	1.3389
1.3330	1.3412	1.3409	1.3402	1.3400	1.3396	1.3393	1.3389	1.3389
1.3330	1.3412	1.3409	1.3401	1.3400	1.3397	1.3394	1.3389	1.3387
1.3330	1.3412	1.3409	1.3401	1.3400	1.3397	1.3393	1.3389	1.3387
	среднее значение							
1.3330	1.34118	1.34093	1.34013	1.34000	1.33963	1.33938	1.33893	1.33880
$(n_i - n_o) \cdot 10^4$	81.7	79.2	71.3	70.0	66.2	63.8	59.2	58.0



Рисунок



Линейная зависимость величин  $(n_i - n_o) \cdot 10^4$  (Y) модельных растворов от концентраций глюкозы (X)

результатов повторных измерений показателя преломления (Табл. 4), результаты определения глюкозы в модельных смесях характеризуются значительной случайной неопределенностью (3.1 %), которая превышает допуски АНД ( $\pm 3\%$ ). Это соответствует прогнозам Табл. 1 ( $\Delta_{As} \leq 4.0\%$ ) и требованиями соотношения (9). Отметим также, что результаты ха-

рактеризуются также значимой систематической погрешностью (1.55 %), что соответствует значимой величине свободного члена линейной зависимости (14).

Для проверки воспроизводимости результатов модельные растворы 3, 4 и 5 были повторно проанализированы другим аналитиком (что позволяет нивелировать субъективный фактор) в другой день (Табл. 6). Различия между результатами исходного и повторного анализов должны удовлетворять соотношению (10).

Как видно, различия между результатами могут превышать 4.0 %, что подтверждает прогнозы Табл. 1 и требования соотношения (10).

Таким образом, реальная неопределенность фармакопейного рефрактометрического количественного определения 5 % водного раствора глюкозы действительно может достигать 4.0 %, и соотношение (9) для результатов участников ППТ является корректным.

3. Аттестация тестовых образцов

Используемые в качестве тестовых образцов (ГО) промышленные серии раствора глюкозы 5 % являются стабильным лекарствен-

Таблица 5

Метрологическая обработка полученных результатов для модельных растворов

№	Введено	Найдено	
	глюкозы безводной, %	% абсолютные	% к введенной глюкозе моногидрату
1.	5.76422	5.757	99.88
2.	5.50048	5.581	101.46
3.	5.27979	5.018	99.41
4.	5.04751	4.930	101.79
5.	4.84312	4.665	101.67
6.	4.58864	4.489	102.78
7.	4.36779	4.173	100.82
8.	4.13863	4.085	104.58
	среднее		<b>101.55</b>
	<i>SD(8)</i>		<b>1.63</b>
	<i>t(95%,7)</i>		<b>1.895</b>
	<i>Δ%(8) единичного результата</i>		<b>3.10</b>
	<i>Δ%(8) среднего результата</i>		<b>1.09</b>
	<i>δ(8)% - систематическая погрешность</i>		<b>1.55</b>

Таблица 6

Результаты повторного анализа модельных растворов № 3-5

№	Данные Таблиц 4-5			Найдено при повторном анализе, %			Dif= 5.7 %
	$n_i - n_o$	% абсолютные	в % к введенному	$n_i - n_o$	% абсолютные	в % к введенному	
3.	0.00713	5.018	99.41	0.00725	5.106	101.15	1.74
4.	0.00700	4.930	101.79	0.007025	4.947	102.15	0.36
5.	0.00662	4.665	101.67	0.00690	4.859	105.90	4.23

ным средством - в том смысле, что концентрация глюкозы в них практически не изменяется во времени. Учитывая, что ППТ проходит в течение 1-2 мес., а срок годности промышленных серий препарата 2 года [5], нет необходимости в изучении стабильности ТО. Однако, одновременно с исследованиями по присвоению аттестованного значения, необходимо подтвердить также однородность (по концентрации глюкозы) ТО, поскольку данный аспект может быть очень существенным для готовых лекарственных средств [1]. Для этого параллельно анализировали по 3 контейнера от каждой серии (по 4 измерения для каждого контейнера). Различия в средних показателях преломления между контейнерами не должны превышать максимально допустимую по ГФУ погрешность показателя преломления —  $2.0 \cdot 10^{-4}$  [4].

### 3.1. Схема эксперимента и требования к результатам

Поскольку, как показали предварительные исследования (см. выше), определение показателя преломления на нецифровом рефрактометре ИРФ-22 характеризуется значительным субъективным фактором, было решено проводить исследования двумя разными аналитиками на двух разных рефрактометрах. Это позволит уменьшить субъективный фактор. Перед каждым анализом проверяли соответствие показателя преломления воды фармакопейному значению 1.3330. По найденным значениям показателя преломления рассчитывали также значение содержания глюкозы ( $X_{abs} \%$ ) по формуле (1).

Различие показателей преломления между разными образцами одной серии тестовых образцов раствора глюкозы 5 % должно быть не более  $2.0 \cdot 10^{-4}$ .

Различие показателей преломления в тестовом образце раствора глюкозы 5 % между разными аналитиками должно быть не более  $2.0 \cdot 10^{-4}$ .

Различие показателей преломления в тестовом образце раствора глюкозы 5 % между разными рефрактометрами (приборами) должно быть не более  $2.0 \cdot 10^{-4}$ .

Для сравнения были проведены также исследование образцов на полуцифровом рефрактометре DR-A1.

### 3.2. Результаты исследований на рефрактометре ИРФ-22

Результаты исследований приведены в Табл. 7.

Как видно из Табл. 7, во всех случаях различие показателей преломления между контейнерами, аналитиками и приборами не превышало  $2.0 \cdot 10^{-4}$ . Таким образом, тестовые образцы можно считать однородными, а различие между аналитиками и приборами несущественными.

Приписными значениями содержания глюкозы по данным Таблицы можно было бы считать:

серия 240803 —  $100.12 \% \approx 100.1 \%$ ,

серия 731103/1 —  $99.30 \% \approx 99.3 \%$ .

Однако при анализе ТО в данном случае очень значимым является субъективный фактор, поскольку номинальная величина показателя преломления для промышленных серий раствора глюкозы 5 % (1.3400) известна аналитикам. Сами же ТО (промышленные серии) удовлетворяют требованиям АНД по содержанию глюкозы (97-103 %).

Поэтому по данным Табл. 7, из-за очень большого влияния субъективного фактора, трудно говорить о каком-либо доверительном интервале для приписных значений, чтобы проверить выполнение соотношения (10). Выборка же из двух рефрактометров слишком маленькая, чтобы среднее значение для них можно было считать хорошей оценкой генерального среднего.

### 3.3. Результаты исследований на полуцифровом рефрактометре DR-A1

Отметим, что, в отличие от рефрактометра ИРФ-22, результаты полуцифрового рефрактометра DR-A1 являются более объективными и позволяют получить метрологические характеристики.

### 3.4. Определение содержания глюкозы в тестовых образцах методом высушивания

Поскольку тестовые образцы промышленных серий 240803 и 731103/1 содержат, согласно АНД [5], только глюкозу и воду, для подтверждения результатов, полученных рефрактометрией, было проведено определение глюкозы в тестовых образцах методом высушивания при температуре  $(100-105)^\circ\text{C}$ . Аргументом для этого стала монография USP 24 (Dextrose) [11], в которой содержание воды в глюкозе моногидрате определяется именно таким образом (что говорит об отсутствии разложения глюкозы в данных условиях).

По 2 мл (3 параллельных) раствора тестовых образцов из одного контейнера каждой серии взвешивали в бюксе и высушивали в

Таблица 7

Результаты исследования тестовых образцов раствора глюкозы 5 % для инфузий на рефрактометре ИРФ-22

Измерение	Аналитик 1			Аналитик 2		
	контейнер 1	контейнер 2	контейнер 3	контейнер 1	контейнер 2	контейнер 3
	<b>серия 240803</b>					
	<b>прибор 1</b> показатель преломления					
1.	1.3404	1.3403	1.3402	1.3401	1.3401	1.3401
2.	1.3401	1.3402	1.3400	1.3403	1.3402	1.3400
3.	1.3401	1.3401	1.3401	1.3401	1.3401	1.3401
4.	1.3401	1.3402	1.3401	1.3401	1.3401	1.3400
среднее контейнера	<b>1.340175</b>	<b>1.3402</b>	<b>1.3401</b>	<b>1.34015</b>	<b>1.340125</b>	<b>1.34005</b>
максимальное различие между контейнерами	$1.0 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$			$1.0 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$		
$\bar{n}$ (аналитик)	1.340158			1.340108		
различие между аналитиками	$0.5 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$					
$\bar{n}$ (прибор)	1.340133					
X%abs	5.023					
X%отн (прибор)	<b>100.47</b>					
	<b>прибор 2</b> показатель преломления					
1.	1.3401	1.3402	1.3401	1.3401	1.3400	1.3400
2.	1.3402	1.3401	1.3400	1.3401	1.3401	1.3400
3.	1.3401	1.3401	1.3401	1.3401	1.3401	1.3401
4.	1.3401	1.3402	1.3400	1.3400	1.3401	1.3400
среднее контейнера	<b>1.340125</b>	<b>1.34015</b>	<b>1.34005</b>	<b>1.340075</b>	<b>1.340075</b>	<b>1.340025</b>
максимальное различие между контейнерами	$1.0 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$			$0.5 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$		
$\bar{n}$ (аналитик)	1.340108			1.340058		
различие между аналитиками	$0.5 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$					
$\bar{n}$ (прибор)	1.340083					
X%abs	4.988					
X%отн (прибор)	<b>99.77</b>					
различие $\bar{n}$ между приборами	$0.5 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$					
<b>общее среднее по серии, %</b>	<b>100.12</b>					
	<b>серия 731103/1</b>					
	<b>прибор 1</b> показатель преломления					
1.	1.3402	1.3400	1.3401	1.3403	1.3400	1.3401
2.	1.3402	1.3400	1.3401	1.3402	1.3400	1.3401
3.	1.3402	1.3400	1.3401	1.3401	1.3400	1.3401
4.	1.3400	1.3400	1.3401	1.3400	1.3400	1.3402
среднее контейнера	<b>1.34015</b>	<b>1.3400</b>	<b>1.3401</b>	<b>1.34015</b>	<b>1.3400</b>	<b>1.340125</b>
максимальное различие между контейнерами	$1.5 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$			$1.5 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$		
$\bar{n}$ (аналитик)	1.340083			1.340092		
различие между аналитиками	$0.00001 < 0.00020$					
$\bar{n}$ (прибор)	1.340088					
X%abs	4.991					
X%отн (прибор)	<b>99.82</b>					



Таблица 7 (продолжение)

Измерение	Аналитик 1			Аналитик 2		
	контейнер 1	контейнер 2	контейнер 3	контейнер 1	контейнер 2	контейнер 3
	серия 731103/1					
прибор 2 показатель преломления						
1.	1.3401	1.3400	1.3400	1.3400	1.3400	1.3399
2.	1.3401	1.3400	1.3400	1.3400	1.3400	1.3400
3.	1.3400	1.3400	1.3400	1.3400	1.3400	1.3400
4.	1.3400	1.3401	1.3401	1.3401	1.3400	1.3399
среднее контейнера	<b>1.34005</b>	<b>1.340025</b>	<b>1.340025</b>	<b>1.340025</b>	<b>1.3400</b>	<b>1.33995</b>
максимальное различие между контейнерами	$0.25 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$			$0.3 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$		
$\bar{n}$ (аналитик)	1.340033			1.339992		
различие между аналитиками	$0.42 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$					
$\bar{n}$ (прибор)	1.340013					
$X\%_{abs}$	4.938					
$X\%_{отн}$ (прибор)	<b>98.77</b>					
различие $\bar{n}$ между приборами	$0.75 \cdot 10^{-4} < 2.0 \cdot 10^{-4}$					
общее среднее по серии, %	<b>99.30</b>					

Таблица 8

Результаты исследования тестовых образцов раствора глюкозы 5 % для инфузий на полуцифровом рефрактометре DR-A1

Показатели	Показатели преломления	
	серия 240803	серия 731103/1
контейнер № 1	1.3402	1.3402
	1.3402	1.3401
	1.3408	1.3404
среднее по контейнеру	1.34040	1.34023
контейнер № 2	1.3406	1.3400
	1.3406	1.3400
	1.3408	1.3407
среднее по контейнеру	1.34067	1.34023
контейнер № 3	1.3405	1.3401
	1.3401	1.3403
	1.3404	1.3398
среднее по контейнеру	1.34033	1.34007
общее среднее	<b>1.34047</b>	<b>1.34018</b>
$SD$	$2.45 \cdot 10^{-5}$	$2.48 \cdot 10^{-5}$
$SD_{tot}$	$2.47 \cdot 10^{-5}$	
$RSD_{tot} \% = 100 \cdot SD_{tot} / 0.00142 / 5.0$	3.47	
$\Delta_{\bar{x}}, \% = t(95, 16) \cdot RSD_{tot} / \sqrt{9}$	<b>2.02</b>	
концентрация глюкозы, % abs.	<b>5.258</b>	<b>5.055</b>
концентрация глюкозы в % к номинальной (5.0%)	<b>105.16</b>	<b>101.10</b>

течение 16 час (как в USP 24 [11]) при температуре (100-105) °С, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Определяли массу остатка и делили ее на 2 (2 мл), определяя содержание глюкозы в 1 мл образца. Результат представляли в процентах к номинальному значению

(0.05 г/мл). Результаты анализа приведены в Табл. 9. При расчетах метрологических характеристик, в частности, объединенного относительного стандартного отклонения  $RSD_{tot}$ , использовали рекомендации ГФУ [6].

3.5. *Определение приписного значения содержания глюкозы в тестовых образцах*

Для расчета приписных значений ( $X_{Att}$ ) содержания глюкозы в ТО применяли формулы (12-13) взвешенного среднего. При этом использовали данные Табл. 7-9. При анализе на рефрактометре ИРФ-22, для которого оценку неопределенности полученных результатов невозможно получить из повторных измерений (в силу крайней субъективности метода), в качестве доверительных интервалов брали величины, полученные из исследований линейности (Табл. 6).

Как видно, неопределенность аттестованных значений ( $\Delta_{Att}$ ) соответствует требованиям соотношения (10) — не более 1.3 %.

**Выводы**

Впервые проведена аттестация двух промышленных серий раствора глюкозы 5 % для инфузий в контейнерах ПВХ, использованных в качестве тестовых образцов в 4 раунде Программы профессионального тестирования лабораторий «Фарма-Тест» в системе Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств МЗ Украины.

Фармакопейный метод рефрактометрического определения раствора глюкозы 5 % на имеющихся в большинстве лабораторий и аптек Украины приборах ИРФ-22 обладает

значительной неопределенностью (около 4 %) и является корректным только при допусках содержания  $\pm 15$  % от номинального значения, а не  $\pm 3$  %, как принято в действующих АНД. Данные АНД нуждаются в пересмотре с целью или адекватного расширения допусков содержания глюкозы, или замены метода. В качестве альтернативного метода может быть использован, в частности, метод высушивания (в том случае, когда нет других компонентов, кроме глюкозы).

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Гризодуб А.И., Архипова Н.Н., Кожушко Г.И., Зволінська Н.Н., Леонтьев Д.А. Аттестация промышленных таблеток в качестве тестовых образцов для профессионального тестирования лабораторий по контролю качества лекарственных средств: учет факторов неоднородности // Фармаком. — 2003. - № 3 — С. 5-19.
2. Зволінська Н.М., Архіпова 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.
3. Леонтьев Д.А., Сур С.В., Архіпова Н.М., Зволінська Н.М., Денисенко Н.В., Доценко Т.М. Створення національної системи атестації лабораторій з контролю якості лікарських засобів: атестація тестового зразка лінкоміцину гідрохлориду для кількісної рідинної хроматографії // Фармацевтичний журнал. - 2004. - № 1. - С.61-67.
4. 2.2.6. Показник заломлення (індекс рефракції) // Державна Фармакопея України / Державне підприємство

Таблица 9

**Определение содержания глюкозы (безводной) в тестовых образцах**

№	Серия 240803			Серия 731103/1		
	Масса 2 мл, г	Масса сухого остатка, г	Содержание глюкозы в % к номинальному	Масса 2 мл, г	Масса сухого остатка, г	Содержание глюкозы в % к номинальному
1.	2.03065	0.10204	102.04	2.03913	0.10251	102.51
2.	2.06562	0.10462	104.62	2.04056	0.09984	99.84
3.	2.05701	0.10345	103.45	2.02667	0.09936	99.36
<b>среднее</b>			<b>103.37</b>			<b>100.57</b>
<i>RSD</i> , %			1.25			1.69
<i>RSD<sub>tot</sub></i> , %				1.48		
$\Delta_{\bar{x}}$ , %				1.83		

Таблица 10

**Определение приписного значения содержания глюкозы в тестовых образцах**

Метод анализа	Серия 240803		Серия 731103/1	
	% к номинальному	$\Delta_{\bar{x}}$ , %	% к номинальному	$\Delta_{\bar{x}}$ , %
Рефрактометр ИРФ 22, прибор 1	100.47	3.10	99.82	3.10
Рефрактометр ИРФ 22, прибор 2	99.77	3.10	98.77	3.10
Полуцифровой рефрактометр	105.16	2.02	101.10	2.02
Метод высушивания	103.37	1.83	100.57	1.83
Приписное значение $X_{Att}$ , %	<b>102.9</b>		<b>100.4</b>	
Неопределенность приписного значения $\Delta_{Att}$ , %	<b>1.15 &lt; 1.3</b>		<b>1.15 &lt; 1.3</b>	

- «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - С. 21-22.
5. ФС 42У-138-1270-01 «Раствор глюкозы 5 %, 10 %, 20 % и 40 % для инъекций в бутылках»; ФС 42У-305-1141-01 «Раствор глюкозы 5 % и 10 % для инъекций (в контейнерах ПВХ)»; ФС 42У-105-900-00 «Раствор глюкозы 5 % и 10 % для инъекций (в полимерной упаковке)»; ФС 42У-12-568-99 «Раствор глюкозы 5 % для инъекций».
6. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - — Доповнення 1. - 2004. - С. 187-214.
7. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 1. Методики ВЭЖХ // Физиологично активні речовини. - 2001. - № 1 (31). - С. 32-44.
8. Валідація аналітичних методик и випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - С. 58-67. - Доповнення 1. - 2004. - С. 2-4.
9. 4. Реактивы // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - С. 169-296.
10. ФС 42У-52/37-709-00 «Глюкоза».
11. Dextrose // USP24-NF19: US Pharmacopeia & National Formulary. - United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1999. - P. 531-532.

#### Резюме

Гризодуб О.І., Леонтьев Д.А., Архіпова Н.М., Зволинська Н.М., Овчинникова Т.І., Денисенко Н.В.

#### Атестация тестовых зразків розчину глюкози 5 % для инфузий для кількісного визначення глюкози методом рефрактометрії

Уперше проведено атестацію двох промислових серій розчину глюкози 5 % для інфузій у контейнерах ПВХ, що використані як тестові зразки у 4 раунді Програми професійного тестування лабораторій «Фарма-Тест» у системі Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів МОЗ України. Фармакопейний метод рефрактометричного кількісного визначення розчину глюкози 5 % на приладах ІРФ-22, що наявні у більшості лабораторій і аптек України, має значну невизначеність (близько 4 %) і є коректним тільки при допусках вмісту  $\pm 15\%$  від номінального значення, а не  $\pm 3\%$ , як прийнято в діючих АНД. Дані АНД потребують перегляду або з метою адекватного розширення допусків вмісту глюкози, або заміни методу. Як альтернативний може бути використаний, зокрема, метод висушування (у тому разі, коли немає інших компонентів, крім глюкози).

#### Summary

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

#### Attestation of test samples of solution glucose 5 % for infusion for glucose assay by refractometry method

The attestation of two industrial batch of solution glucose 5 % for infusion in PVC containers, which have been

used as the test samples at the 4<sup>th</sup> round of the laboratories Professional Testing Program «Pharma – Test» in the system of the State Inspection for Medication Quality Control of Ukrainian Ministry of Health, for the first time was conducted. Pharmacopoeia method of refractometry determination of solution glucose 5 % on existent in a majority of laboratories and pharmacies of Ukraine IRP – 22 instruments has considerable uncertainty (about 4 %) and is correct only with content tolerances of  $\pm 15\%$  from rating, but not  $\pm 3\%$ , as it is accepted in specification in force. Specification data are in need of revision with the purpose of or adequate broadening of glucose content limit, or method replacement. As alternative method may be used, in particular, the method of drying (in that case, if there are no other components except glucose).

**Гризодуб Александр Иванович.** Окончил химический факультет Харьковского государственного университета (1971). Зав. лабораторией хроматографии ГП ГНЦЛС. Зам. директора ГП «Науково-експертний фармакопейний 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).

**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-експертний фармакопейний центр». К.фарм.н. (1997).

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

**Зволинская Наталья Николаевна.** Инженер 1 кат. Центральной лаборатории по анализу качества лекарственных средств МЗ Украины.

**Овчинникова Татьяна Ивановна.** Окончила Харьковский государственный университет (1996). Работает в отделе ГФУ ГП «Научно-експертний фармакопейний центр» (с 1996). Мл. науч. сотрудник группы «Валидация методик, стандартные образцы и метрология».

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

## До видання Доповнення 2 до Державної Фармакопеї України

УДК 615.456.07

Доля В.Г., Товмасян Е.К., Гризодуб А.И., Георгиевский В.П.

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

### Контроль невидимых механических включений в лекарственных средствах для парентерального применения: изменения в статье Государственной Фармакопеи Украины

Проведен анализ статей ведущих Фармакопей по контролю невидимых механических включений в лекарственных средствах для парентерального применения и нормативного документа, действующего в Украине. Обсуждаются изменения к общей статье ГФУ 1 «2.9.19. Механические включения: невидимые частицы» и предложен проект пересмотренной статьи, планируемой ко введению в Дополнение 2 к ГФУ 1. Представлены также изменения к общей статье ГФУ 1 «Лекарственные средства для парентерального применения», касающиеся испытания на механические включения: невидимые частицы.

Одним из обязательных испытаний при контроле качества лекарственных средств для парентерального применения является испытание на наличие механических включений. Механическими включениями (МВ) в инъекционных и инфузионных растворах, как известно, называют посторонние, нерастворимые видимые и невидимые частицы, кроме пузырьков газа [1]. Принято невидимыми называть частицы размером менее 50 мкм, а видимыми — более 50 мкм.

Избыточное содержание механических включений в парентеральных лекарственных средствах может вызывать различные поражения органов и тканей: тромбы, флебиты, эмболии, гранулемы, аллергические реакции и др. патологические явления [2]. Степень неблагоприятных последствий при попадании в организм зависит от размера, количества и природы этих частиц. Особенно опасно попадание частиц в кровяное русло, откуда они могут проникнуть в легочную артерию, которая разветвляется на множество капилляров. Капилляры имеют диаметр 7-12 мкм, поэтому частицы большего размера могут закупорить их [2-4].

Вероятными источниками МВ, попадающих в препараты, могут быть субстанции, вспомогательные вещества, технологическое оборудование, материалы первичной упаковки (флаконы, ампулы, пробки), воздух производственных помещений, персонал; они могут попасть в готовый продукт на любой стадии процесса производства. Даже при производстве парентеральных лекарственных средств в условиях надлежащей производственной практики (GMP) не удастся полностью исключить контаминацию МВ. В этой

связи развитие методов контроля МВ в парентеральных лекарственных средствах и гармонизация требований и условий проведения испытаний в разных странах остается одной из важнейших задач ведущих Фармакопей [5].

Испытание на МВ введены во все ведущие Фармакопеи и, безусловно, было введено и в Государственную Фармакопею Украины 1-го издания (ГФУ 1) в виде 3 статей раздела 2.9. Фармако-технологические испытания: «2.9.19. Механические включения: невидимые частицы», «2.9.20. Механические включения: видимые частицы» и «2.9.21. Механические включения: метод микроскопии» [1]. Следует отметить, что данные статьи не были исчерпывающими, и работают они совместно с действующей Инструкцией «Контроль лекарственных средств для парентерального применения на механические включения» (РД 42У-001-93). В ней более подробно описан процесс проведения испытания на невидимые частицы с использованием фотометрического счетчика, принцип действия которого основан на методе светоблокировки, и приведена регламентация частиц в растворах для инъекций и инфузий. Также подробно описан широко используемый процесс контроля видимых частиц при производстве и контроле качества, даны параметрами оценки препаратов на наличие видимых частиц и приведена регламентация частиц в инъекционных растворах [6].

Целью данной статьи является анализ состояния вопроса по контролю невидимых механических включений в ведущих Фармакопеях, внесение изменений в общую статью ГФУ по их контролю и представлению проек-

та пересмотренной статьи, планируемой к введению в Дополнение 2 к ГФУ 1.

В процессе гармонизации Европейской Фармакопеи (ЕФ) [7, 8] с Американской (USP) [9] и Японской Фармакопеями [10] статья 2.9.19. в 4 издании ЕФ (2002) претерпела существенные изменения. При этом две статьи 2.9.19. и 2.9.21. по контролю невидимых частиц были объединены в одну и дополнены. В качестве методов контроля невидимых механических включений приведены метод светоблокировки и метод микроскопии.

Метод светоблокировки основан на принципе поглощения частицами проходящего света. Многие фирмы производят автоматические счетчики, в основу работы которых положен этот принцип: «НІАС», «Climet», «PMS», «APSS», «AccuSizer» (США); RION KL-04 (Япония), «Kratel», «Fritsch», «Grimm» (Германия); ПКЖ-904 (Россия); «Аналитприбор» (Грузия) и др. Данные приборы позволяют определить количество частиц в заданном объеме жидкости, а также распределение их по размерам. Действие приборов основано на прохождении исследуемого раствора (под действием вакуума, с постоянной скоростью) через кювету, расположенную между источником света (лампа накаливания или лазер) и фотодиодом. Площадь сечения кюветы составляет (0.025-0.05) мм<sup>2</sup>, и при концентрациях, не превышающих пороговые значения, частицы проходят в потоке жидкости через кювету последовательно по одной, при этом они пересекают луч света и снижают первоначальную интенсивность светового потока. Амплитуда возникающего сигнального импульса пропорциональна площади проекции (тени) частицы в плоскости, перпендикулярной световому лучу. При этом размер частицы регистрируется как диаметр круга, имеющего площадь, эквивалентную площади проекции; для частиц удлиненной формы, в том числе волокон, этот полученный размер может значительно отличаться от максимального линейного [11].

Существуют и другие фотометрические счетчики, работающие на принципе рассеивания света, но их не рекомендуется использовать при контроле парентеральных лекарственных средств. Основное различие между этими системами и приборами на основе светоблокировки состоит в том, что они измеряют свет дифракции вместо света, который блокируется частицами, проходящими через чувствительную ячейку. Подобные приборы (типа НІАС/NICOMP, SALD,

RION KL-01 (Япония)) имеют системы линз, фокусирующих пучок света на чувствительный объем ячейки с проходящим через нее потоком жидкости. Присутствие частиц вызывает дифракцию светового луча в пределах трубки фотоумножителя за счет серии линз, при этом образуется импульс тока. Амплитуда импульса зависит от количества падающего света, которое пропорционально размеру частицы. За счет использования электронных затворов можно определить количество и размер частиц, проходящих через чувствительную зону. Эти приборы могут быть сконструированы таким образом, чтобы детектировать светорассеяние в направлении падения луча или под прямым углом; они определяют размер частиц как диаметр круга, имеющего площадь, эквивалентную площади поперечного сечения частицы [11].

Следует отметить, что в статью ЕФ включены лишь общие принципы проведения испытания, без детализации таких моментов как процедура стандартизации прибора, проверка правильности отобранного объема пробы, скорость течения пробы, методы калибровки прибора, разрешающей способности датчика и правильность подсчета частиц и др. В USP в то же время весьма детально освещены эти моменты, приведены методы немеханизированной, автоматической и электронной калибровки прибора и разрешающей способности датчика [9]. Частично, менее подробно, эти моменты освещены и в JP [10]. В указанных Фармакопеях несколько разнятся пределы размеров частиц, используемых при калибровке прибора: если ранее по требованиям ЕФ калибровку следовало осуществлять дисперсией стандартных сферических частиц размерами от 5 мкм до 25 мкм, то сейчас — от 10 мкм до 25 мкм, что аналогично требованиям USP, но отличается от требований JP (5-25 мкм). Контроль соответствия условий проведения испытания необходимым требованиям и надлежащее качество очистки стеклянной посуды и воды, согласно ЕФ, регламентируют наличием в 25 мл пробы не более 25 частиц размером 10 мкм или более, в то время как в USP и JP предъявляют более жесткие требования: т.е в 25 мл пробы не более 25 частиц размером 10 мкм и более, из них не более 2 частиц размером 25 мкм и более.

По сравнению с ЕФ в USP также более подробно расписана процедура пробоподготовки и последующего подсчета частиц. Даны формулы расчета для инъекционных препаратов малого и большого объемов.



Приведено также нормирование частиц в препаратах, которое аналогично во всех указанных Фармакопеях. В JP нормирование приведено в статье на лекарственные средства для парентерального применения (Таблица).

Статья 2.9.19. в редакции ЕФ приведена во всех Фармакопеях стран ЕС, а также в Британской Фармакопее (BP) [12-14]. Примечательно, что в BP 2001, как и в Дополнении ЕФ, 2000 отдельно приведена регламентация частиц в порошках для парентерального применения. В более поздних изданиях ЕФ отдельная регламентация МВ в порошках исключена и к ним предъявляются те же критерии оценки, что и к приготовленным из них парентеральным препаратам соответствующих объемов.

Метод микроскопии для контроля невидимых частиц используют достаточно долго и практически повсеместно. В части данного метода статья не претерпела значительных изменений. В новой редакции статья ЕФ также гармонизирована со статей USP без введения подробностей по подготовке микроскопа и фильтрационного устройства, методик пробоподготовки и подсчета частиц.

Мембранно-микроскопический метод, предложенный в статье 2.9.19. ЕФ, необходим для контроля МВ в препаратах, которые не соответствуют предельным значениям по методу светоблокировки или которые не могут быть испытаны методом светоблокировки. К ним можно отнести препараты, склонные к образованию пузырьков воздуха или газа при прохождении через зону контролирования прибора, а также коллоиды, эмульсии и липосомальные препараты.

Следует отметить, что в РД 42У-001-93 отсутствует описание микроскопического метода контроля, однако указанный метод отнюдь не является новым для отечественных производителей, так как является фармакопейным и описан в статье «2.9.21. Механические

включения: метод микроскопии» ГФУ 1 [1].

Анализ литературы, а также полученные экспериментальные результаты исследования инъекционных лекарственных средств отечественного производства [15] дают основание внести в Дополнение 2 к ДФУ 1 обновленную статью «2.9.19. Механические включения: невидимые частицы» и отменить статью «2.9.21. Механические включения: метод микроскопии».

Предлагаем также обсудить весьма существенное изменение к общей статье ГФУ 1 «Лекарственные средства для парентерального применения», планируемое к введению в Дополнение 2 к ГФУ 1, касающееся испытания на МВ. В европейскую часть пересмотренной статьи в раздел «Испытания» будет введено испытание «Механические включения: невидимые частицы (2.9.19)», содержащее такое требование: «Растворы для инъекций или инфузий для применения человеком в контейнерах с номинальным объемом более 100 мл должны выдерживать испытание на механические включения: невидимые частицы». Если в ГФУ 1 в этой статье лишь в национальной части было общее требование о необходимости соответствия парентеральных препаратов требованиям статей по механическим включениям (2.9.19-2.9.21), и это трактовалось прежде всего, как отсутствие видимых частиц, то сейчас для растворов объемом более 100 мл непременно следует контролировать невидимые частицы одним из методов, приведенных в соответствующей статье ГФУ. С введением в действие данной пересмотренной статьи возникнут проблемы как у многих отечественных производителей инъекционных и инфузионных препаратов, так и у аптек, производящих подобные препараты. В аптеках контроль качества лекарственных средств проводят по документу «Инструкция о контроле качества лекарственных средств, изготавливаемых в аптеках»,

Таблица

**Нормы предельно допустимого содержания невидимых частиц в лекарственных средствах для парентерального применения для инструментальных методов контроля по EP, USP и JP**

Метод контроля	Объем, мл	Размер частиц, мкм			
		≥ 10 мкм		≥ 25 мкм	
		допустимое количество частиц			
		1 мл	контейнер	1 мл	контейнер
светоблокировка	малый объем		6000		600
мембранно-микроскопический	≤ 100 мл		3000		300
светоблокировка	большой объем	25		3	
мембранно-микроскопический		>100 мл	12		2

утвержденной Приказом МЗ СССР № 96 от 3.04.1991 года, в котором имеется раздел по контролю МВ в инъекционных, офтальмологических растворах и глазных каплях (Приложение 9). Контроль осуществляют визуальным методом, исключается наличие лишь видимых частиц. Если образцы инъекционных препаратов ведущих украинских производителей удовлетворяют требования по МВ на невидимые частицы, то данными по качеству инфузионных растворов аптечного приготовления мы не располагаем. Поднимая этот вопрос, следует понимать, что отсутствие инструментальной базы в аптеках и в ряде фармфирм не может быть оправданием низкого качества препаратов и не указывает на необходимость в очередной раз откладывать уже сточение требований в ГФУ.

*Призываем всех заинтересованных лиц принять участие в обсуждении данной проблемы.*

*Обращаем внимание читателей, что замечания и предложения по проекту статьи и обсуждаемым проблемам направлять в адрес ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» (отдел ГФУ) или журнала «Фармаком».*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
2. Turco S., Davis N.M. Clinical significance of particulate matter: a review of the literature // Hosp. Pharm. - 1973. - Vol. 8., No. 5. - P. 137-139.
3. Hopkins G.H., Young R.W. Correlation of microscopic with instrumental particle counts // Bull. Parent. Drug Assoc. - 1974. - Vol. 28, No. 1. - P. 15-25.
4. Particulate matter in parenteral products: a review / Borchert S.J., Abe A., Aldrich D.S. et al. // J. Patent. Sci. Technol. - 1986. - Vol. 40, No. 5. - P. 212-23.
5. Доля В.Г., Асмолова Н.М., Конев Ф.А., Гризодуб О.І. Еволюція вимог до вмісту механічних включень в парентеральних розчинах // Фармаком - 1999. - № 2. - С. 42-45.
6. КД 42У-001-93. Інструкція. Контроль лікарських засобів для парентерального застосування на механічні включення // Київ. - 1993. - 16 с.
7. European Pharmacopeia. - 4<sup>th</sup>ed. - Strasbourg, 2001. - 2416 p.
8. European Pharmacopeia. - 5<sup>th</sup>ed. - Strasbourg, 2005. - 2781 p.
9. United States Pharmacopeia. - 24 ed. - Rockville, 2000. — 2569 p.
10. The Japanese Pharmacopeia. - XIV ed. — 2001. - 1090 p.
11. Доля В.Г. Методи контролю наявності механічних включень в ін'єкційних розчинах // Фармаком — 2002. - № 1. - С. 62-64.
12. British Pharmacopeia. — V. 1. - London, HMSO, 2001. — 1389 p.
13. Pharmacopea ufficiale della Repubblica Italiana. - XI ed. — Roma, 2002. — 1230 p.
14. Český Lékopis, 2002. - Doplnek 2003. — Praha: Grada Publishing, a.s., 2003. — 7294 s.
15. Доля В.Г. Розробка методів контролю механічних включень та їх стандартизація в лікарських засобах для парентерального застосування: Автореф. дис. канд.фармац. наук. — Харків, 2002. - 19 с.

#### Резюме

Доля В.Г., Товмасын С.К.,  
Гризодуб О.І., Георгієвський В.П.

#### Контроль невидимих механічних включень у лікарських засобах для парентерального застосування: зміни до статті Державної Фармакопеї України

Проведено аналіз статей провідних Фармакопей щодо контролю невидимих механічних включень у лікарських засобах для парентерального застосування та нормативного документу, що діє в Україні. Обговорюються зміни до загальної статті ДФУ 1 «2.9.19. Механічні включення: невидимі частки» та запропоновано проєкт переглянутої статті, що планується до введення у Доповнення 2 до ДФУ 1. Представлено також зміни до загальної статті ДФУ 1 «Лікарські засоби для парентерального застосування», щодо випробування на механічні включення: невидимі частки.

#### Summary

Dolya V.G., Tovmasyan E.K.,  
Gryzodub A.I., Georgiyevskiy V.P.

#### The control of sub-visible particulate contamination in parenteral preparations: changes in the general monograph of the State Pharmacopoeia of Ukraine

An analysis of monographs of leading Pharmacopoeias at the control of sub-visible particle contamination in parenteral preparations and specification currently in force in Ukraine has been performed. Changes to general monograph of SPU 1 «2.9.19. Particulate contamination: sub-visible particles» and the draft of revised general monograph, which has been planned for introduction to SPU Supplement 2, was discussed. Also changes to the general monograph of SPU 1 «Parenteral preparations», which was referring to test on particulate contamination: sub – visible particles have been discussed.

**Доля Владимир Григорьевич.** Окончил Харьковский автомобильный институт (1981). Ст. науч. сотр. лаб. инфузионных и пероральных жидких лекарственных средств ГП ГНЦЛС. К.фарм.н. (2002).

**Товмасын Ерану Карпетовна.** Окончила Ереванский государственный университет (1984). К.б.н. Руководитель направления «Общие статьи на дозированные лекарственные средства и фармако-технологические испытания» отдела ГФУ ГП НЭФЦ.

**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).

**Георгієвський Віктор Петрович.** Окончил фармацевтическое отделение 1-го Московского мединститута (1959). Работает в ГП ГНЦЛС (с 1958). Д.фарм.н. (1980). Чл.-корр. НАН Украины. Директор ГП ГНЦЛС. Директор ГП НЭФЦ. Засл. деятель науки и техники Украины. Руководитель работ по созданию Государственной Фармакопеи Украины.

**ПРОЕКТ****2.9.19. МЕХАНІЧНІ ВКЛЮЧЕННЯ:  
НЕВИДИМІ ЧАСТКИ**

Механічні включення ін'єкційних і внутрішньовенних інфузійних розчинів — це побічні рухомі нерозчинні частки, за винятком бульбашок газу, випадково присутні у розчинах.

Для контролю механічних часток далі описуються 2 методи: Метод 1 (Випробування на механічні включення методом світлоблокування) і Метод 2 (Випробування на механічні включення методом мікроскопії). Для дослідження невидимих часток в ін'єкційних і внутрішньовенних інфузійних розчинах переважно застосовують Метод 1. Однак, для деяких препаратів може бути необхідне проведення випробування на механічні включення методом світлоблокування з подальшим проведенням випробування на механічні включення методом мікроскопії для того, щоб можна було зробити висновок про відповідність препарату встановленим вимогам.

Не всі лікарські засоби для парентерального застосування можуть бути досліджені на вміст невидимих часток одним або обома зазначеними методами. Якщо Метод 1 непридатний, наприклад, у разі зниженої прозорості або підвищеної в'язкості препарату, для проведення випробування використовують Метод 2. Прикладами є емульсії, колоїдні розчини та ліпосомальні препарати. Аналогічно препарати, що створюють повітряні або газові бульбашки при попаданні до датчика, також вимагають застосування методу мікроскопії. Якщо в'язкість випробовуваного препарату досить висока, що перешкоджає його випробуванню будь-яким із даних методів, можна застосувати кількісне розведення підходящим розчинником із метою зниження в'язкості до необхідної величини для того, щоб забезпечити можливість проведення аналізу.

Результати, одержані при дослідженні на механічні включення окремої дозованої одиниці або групи дозованих одиниць препарату, не можуть бути із впевненістю екстрапольовані на інші дозовані одиниці, що залишилися не випробуваними. Таким чином, якщо з одержаних даних необхідно зробити вірні й обґрунтовані висновки, щоб охарактеризувати рівень механічних включень у великій групі дозованих одиниць, слід розробити статистично обґрунтований план відбору проб.

**МЕТОД 1. ВИПРОБУВАННЯ  
НА МЕХАНІЧНІ ВКЛЮЧЕННЯ МЕТОДОМ  
СВІТЛОБЛОКУВАННЯ**

Використовують підходящий прилад, заснований на принципі світлоблокування, який дозволяє автоматично вимірювати кількість і розмір часток.

Прилад калібрують, використовуючи підходящі сертифіковані матеріали порівняння, що складаються з дисперсій сферичних часток відомих розмірів - від 10 мкм до 25 мкм. Такі стандартні частки дисперговані у воді, вільній від часток, Р. Слід вжити заходи, що дозволяють уникнути агрегації часток при диспергуванні.

**Загальні застереження.** Випробування необхідно здійснювати в умовах, що обмежують попадання механічних включень, найкраще в зоні ламінарного потоку повітря.

Дуже ретельно промивають використовуваний скляний посуд і фільтраційне обладнання, крім мембранних фільтрів, теплим розчином миючого засобу із подальшим обполіскуванням необхідною кількістю води для видалення слідів миючого засобу. Безпосередньо перед випробуванням обполіскують обладнання від верху до низу, зовні і потім всередині водою, вільною від часток, Р.

Необхідно виключити виникнення бульбашок повітря у випробовуваному зразку, особливо під час перенесення проби до посудини, в якій буде проводитися вимірювання.

Для того, щоб переконатися у відповідності умов проведення випробування необхідним вимогам і належній якості очищення скляного посуду і води, необхідно виконати таке випробування. Визначають наявність механічних включень у п'яти пробах води, вільної від часток, Р (кожна по 5 мл), згідно з методикою, описаною нижче. Якщо у 25 мл об'єднаної проби кількість часток розміром 10 мкм або більше перевищує 25, прийняті запобіжні заходи для проведення випробувань недостатні. Повторюють підготовчі стадії, доки обладнання, скляний посуд і вода не стануть придатними для проведення випробування.

**Методика.** Перемішують вміст зразка, повільно та безперервно перевертаючи контейнер 20 разів. Якщо необхідно, обережно видаляють упаковку. Зовнішні поверхні контейнера, що розкривають, очищають струменем

води, вільної від часток, Р і розкривають контейнер, уникаючи внесення будь-якого забруднення. Для видалення бульбашок повітря використовують підхожу процедуру, наприклад, відстоюють розчин протягом 2 хв або обробляють ультразвуком.

Для лікарських засобів для парентерального застосування великих об'ємів випробовують окремі дозовані одиниці. Для лікарських засобів для парентерального застосування малих об'ємів менше 25 мл об'єднують 10 або більше дозованих одиниць у чистому контейнері для одержання об'єму не менше 25 мл; в об'єднаних і дозволених випадках випробовуваний розчин може бути приготований за допомогою змішування вмісту підхожої кількості флаконів і розведення до об'єму 25 мл водою, вільною від часток, Р або підхожим розчинником, вільним від механічних часток, якщо вода, вільна від часток, Р, непридатна. Випробування лікарських засобів для парентерального застосування малих об'ємів зі вмістом 25 мл або більше, можуть бути проведені індивідуально.

Порошки для парентерального застосування розчиняють у воді, вільній від часток, Р, або у підхожому розчиннику, вільному від часток, якщо вода, вільна від часток, Р, непридатна. Кількість випробовуваних зразків має бути достатньою для забезпечення статистично обгрунтованої оцінки. Для лікарських засобів для парентерального застосування великих об'ємів або малих об'ємів зі вмістом 25 мл або більше, можуть бути випробувані менше 10 дозованих одиниць із використанням підхожого плану відбору проб.

Відбирають 4 проби, не менше 5 мл кожна, і визначають кількість часток із розмірами, рівними або що перевищують 10 мкм і 25 мкм. Виключають результат, одержаний для першої проби, і розраховують середню кількість часток у випробовуваному зразку.

**Оцінка результатів.** Для лікарських засобів у контейнерах із номінальним об'ємом більше 100 мл застосовують критерій випробування 1.А.

Для лікарських засобів у контейнерах із номінальним об'ємом менше 100 мл застосовують критерій випробування 1.В.

Для лікарських засобів у контейнерах із номінальним об'ємом 100 мл застосовують критерій випробування 1.В.

Якщо середня кількість часток перевищує граничні значення, проводять випробування препарату на механічні включення методом мікроскопії.

*Випробування 1.А - Розчини для інфузій або розчини для ін'єкцій у контейнерах із номінальним об'ємом більше 100 мл*

Препарат витримує випробування, якщо середня кількість часток у випробовуваних одиницях не перевищує 25 в 1 мл для часток розміром 10 мкм або більше і не перевищує 3 в 1 мл для часток розміром 25 мкм або більше.

*Випробування 1.В - Розчини для інфузій або розчини для у контейнерах із номінальним об'ємом менше 100 мл*

Препарат витримує випробування, якщо середня кількість часток у випробовуваних одиницях не перевищує 6000 в 1 контейнері для часток розміром 10 мкм або більше і не перевищує 600 в 1 контейнері для часток розміром 25 мкм або більше.

## МЕТОД 2. ВИПРОБУВАННЯ НА МЕХАНІЧНІ ВКЛЮЧЕННЯ МЕТОДОМ МІКРОСКОПІЇ

Використовують підхожий бінокулярний мікроскоп, фільтруючий пристрій для затримання механічних включень і мембранний фільтр для випробування.

Мікроскоп має бути споряджений окулярним мікрометром, який калібрований по об'єкт-мікрометру, механічним столиком, здатним утримувати і переміщувати фільтраційну площу мембранного фільтра, 2 підхожими освітлювачами для забезпечення епіскопічного освітлення і додаткового бокового освітлення та відрегульований на збільшення  $\times 100 \pm 10$ .

Окулярний мікрометр становить собою кругову діаметральну окулярну сітку (див. Рис. 2.9.19.-1), що складається з великого круга, розділеного візирними перехрестями на квадранти, прозорих і чорних еталонних кругів діаметром 10 мкм і 25 мкм при 100-кратному збільшенні та лінійної шкали, градуйованої із кроком 10 мкм. Калібрування проводять, використовуючи об'єкт-мікрометр, сертифікований національною або міжнародною організацією стандартизації. Припустима відносна похибка лінійної шкали окулярної сітки у межах  $\pm 2\%$ . Великий круг означає поле зору окулярної сітки (ПЗОС).

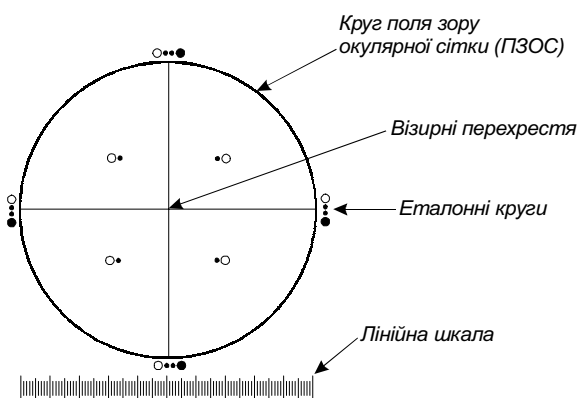


Рисунок 2.9.19-1. Кругова діаметральна окулярна сітка

Необхідні два освітлювача. Один - внутрішній епіскопичний з яскравим полем освітлення, другий - зовнішній додатковий освітлювач, що може фокусуватися і регулюється, щоб забезпечувати відбите бокове освітлення під кутом 10-20°.

Фільтраційний пристрій для затримання механічних включень складається із фільтротримача, виготовленого зі скла або іншого підходящого матеріалу, і обладнаний джерелом створення вакууму та підходящим мембранним фільтром.

Мембранний фільтр повинен мати відповідний розмір, має бути забарвлений у чорний або темно-сірий колір, може бути з нанесеною сіткою або без неї та має номінальний розмір пор 1.0 мкм або менше.

**Загальні застереження.** Випробування проводять в умовах, що обмежують забруднення механічними частками, переважно, у зоні ламінарного потоку повітря.

Дуже ретельно промивають використовуваний скляний посуд і фільтраційне обладнання, крім мембранного фільтра, теплим розчином миючого засобу з подальшим обполіскуванням необхідною кількістю води для видалення залишків миючого засобу. Безпосередньо перед випробуванням обполіскують обладнання від верху до низу, зовні та потім всередині водою, вільною від часток, Р.

Для того, щоб переконатися у відповідності умов проведення випробування необхідним вимогам і належній якості очищення скляного посуду, мембранного фільтра та води, необхідно виконати таке випробування. Визна-

чають наявність механічних включень у 50 мл води, вільної від часток, Р, згідно з методикою, описаною нижче. Якщо в зоні фільтрації кількість часток розміром 10 мкм або більше перевищує 20, а кількість часток розміром 25 мкм або більше перевищує 5, прийняті запобіжні заходи для проведення випробувань недостатні. Повторюють підготовчі стадії, доки обладнання, скляний посуд, мембранний фільтр і вода не стануть придатними для проведення випробування.

**Методика.** Перемішують вміст зразків, повільно та послідовно перевертаючи контейнер 20 разів. Якщо необхідно, обережно видаляють упаковку. Зовнішні поверхні контейнера, що розкривають, очищають струменем води, вільної від часток, Р і розкривають контейнер, уникаючи внесення будь-якого забруднення.

Для лікарських засобів для парентерального застосування великих об'ємів випробовують окремі дозовані одиниці. Для парентеральних розчинів об'ємом менше 25 мл об'єднують 10 або більше дозованих одиниць в очищеному контейнері; якщо це обгрунтовано і дозволено, випробовуваний розчин може бути приготований за допомогою змішування вмісту відповідної кількості флаконів і розведення до об'єму 25 мл водою, вільною від часток, Р або підходящим розчинником, вільним від часток, якщо вода, вільна від часток, Р непридатна. Випробування лікарських засобів для парентерального застосування малих об'ємів зі вмістом 25 мл або більше можуть бути проведені індивідуально.

Порошки для парентерального застосування розчиняють у воді, вільній від часток, Р або у підходящому розчиннику вільному від часток, якщо вода, вільна від часток, Р непридатна.

Кількість випробовуваних зразків має бути достатньою для забезпечення статистично обгрунтованої оцінки. Для лікарських засобів парентерального застосування великих об'ємів або малих об'ємів, що містять 25 мл або більше, можуть бути випробовувані менше 10 дозованих одиниць із використанням підходящого плану відбору проб.

Змочують внутрішню поверхню фільтротримача з мембранним фільтром, декількома мілілітрами води, вільної від часток, Р. Переносять у фільтраційну лійку весь об'єм об'єднаного розчину або однієї одиниці та створюють вакуум. Якщо необхідно, додають роз-

чин порціями, поки не буде профільтований весь об'єм. Після останнього додавання розчину починають обполіскування внутрішніх стінок фільтротримача струменем *води, вільної від часток, Р*. Вакуум відключають не відразу для того, щоб підсушити поверхню мембранного фільтра. Фільтр поміщають у чашку Петрі та висушують на повітрі, нещільно прикривши кришку. Після того, як фільтр висушений, поміщають чашку Петрі на столик мікроскопа, ретельно досліджують весь мембранний фільтр при відбитому світлі від освітлювального пристрою та підраховують частки розміром 10 мкм або більше і розміром 25 мкм або більше. Альтернативно допускається підрахування числа часток на окремій частині фільтра з подальшим перерахуванням загальної кількості часток на весь фільтр. Обчислюють середню кількість часток у випробовуваному зразку.

Процес визначення розміру часток із використанням круглої діаметральної окулярної сітки проводять за допомогою уявного перетворення зображення кожної частки в круг і подальшого порівняння її з еталонними кругами окулярної сітки, діаметр яких становить 10 мкм і 25 мкм. Таким чином, частки не переміщуються зі свого початкового місцеположення в межах поля зору окулярної сітки і не накладаються на еталонні круги. Внутрішній діаметр прозорих еталонних кіл окулярної сітки використовують для визначення розміру білих і прозорих часток, у той час як розмір темних часток визначають, використовуючи зовнішній діаметр чорних непрозорих еталонних кругів окулярної шкали.

При проведенні випробування на механічні частки методом мікроскопії не слід намагатися визначити розмір або кількість аморфних, напіврідких або інших морфологічно розпливчастих матеріалів, що на мембранному

фільтрі мають вигляд плями або знебарвлення. Ці матеріали мають незначний рельєф поверхні або не мають його зовсім і характеризуються желатиноподібним або плівкоподібним зовнішнім виглядом. У цьому разі інтерпретації підрахунку може сприяти проведення випробування проби розчину на механічні включення методом світлоблокування.

**Оцінка результатів.** Для лікарських засобів у контейнерах із номінальним об'ємом більше 100 мл застосовують критерій випробування 2.А.

Для лікарських засобів у контейнерах із номінальним об'ємом менше 100 мл застосовують критерій випробування 2.В.

Для лікарських засобів у контейнерах із номінальним об'ємом 100 мл застосовують критерій випробування 2.В.

*Випробування 2.А - Розчини для інфузій або розчини для ін'єкцій у контейнерах із номінальним об'ємом більше 100 мл.*

Лікарський засіб витримує випробування, якщо середня кількість часток у випробовуваних одиницях не перевищує 12 на 1 мл для часток розміром 10 мкм або більше і не перевищує 2 на 1 мл для часток розміром 25 мкм або більше.

*Випробування 2.В - Розчини для інфузій або розчини для ін'єкцій у контейнерах із номінальним об'ємом менше 100 мл.*

Лікарський засіб витримує випробування, якщо середня кількість часток у випробовуваних одиницях не перевищує 3000 на 1 контейнер для часток розміром 10 мкм або більше і не перевищує 300 на 1 контейнер для часток розміром 25 мкм або більше.

УДК 615.11:615.322

Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

## Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Бузины цветки»

Проведен сравнительный анализ показателей качества цветков бузины, регламентируемых ЕФ и ГФ XI. Более полный набор показателей предполагает принятие монографии ЕФ к введению в ГФУ. Показано, что по всем показателям качества отечественное лекарственное растительное сырье соответствует требованиям ЕФ.

В предыдущих публикациях [1, 2] нами рассматривался вопрос о возможности гармонизации национальной законодательной базы на лекарственное растительное сырье, стандартизация которого проводится по фенолпропаноидам, с Европейской Фармакопеей [3].

Бузина черная (*Sambucus nigra* L.), сем. астровых — Asteraceae — кустарник или небольшое дерево 2 - 6 м высотой, с пепельно-серой трещиноватой корой; молодые ветви зеленые, затем буровато-серые, с многочисленными желтоватыми чечевичками; сердцевина ветвей белая, мягкая. Листья супротивные, непарноперистые, с 3 - 7 яйцевидными или продолговато-яйцевидными, по краям неравномерно пильчатыми листочками, сверху темно-зелеными, снизу более светлыми. Цветки мелкие, желтовато-белые, пахучие, собраны в многоцветковые щитковидные соцветия. Плод — сочная, черно-фиолетовая ягодообразная костянка, до 7 мм в диаметре, с 2—4 косточками. Цветет в июне - июле. Плоды созревают в августе - сентябре.

Произрастает в подлеске широколиственных, реже смешанных лесов, на опушках, в зарослях кустарников в Прибалтике, Белоруссии, Украине. Промышленные заготовки этого растения производятся преимущественно в Закарпатской, Львовской, Ивано-Франковской, Черновицкой, Тернопольской, Хмельницкой, Полтавской, Сумской, Харьковской, Донецкой областях [4].

Химический состав цветков бузины представлен в первую очередь флавоноидами (содержание их может достигать до 3 % [5]). Среди флавоноидов отмечают: рутин (около 0.3 %), кемпферол, кверцетин, астрагалин, изокверцетин, гиперозид. Кроме флавоноидов, характерным компонентом цветков бузины является цианогликозид самбунигрин, который разлагается на бензальдегид, синильную кислоту и глюкозу, а также алкалоид самбуцин. Определяют также около 1 %

тритерпенов ( $\alpha$ - и  $\beta$ -амирины, урсоловая, олеаноловая кислоты), около 1 % стероидов ( $\beta$ -ситостерин, кампестерин, стигмастерин), около 3 % фенольных кислот и их производных (хлорогеновая, феруловая, о-кумаровая, кофейная кислоты), а также до 0.15 % эфирного масла [5, 6, 7]. В составе цветков присутствуют также дубильные вещества, слизи и кислота аскорбиновая. Плоды бузины имеют иной химический состав, одним из основных компонентов которого являются антоцианиды [6, 8].

Стандартизация цветков бузины в ведущих Фармакопеях проводится по количественному содержанию суммы флавоноидов, рассчитанных как изокверцитрин, с регламентацией не менее 0.8 % [3, 5, 9, 10].

Целью настоящей работы является исследование возможности гармонизации национальной законодательной базы (ГФУ) по контролю качества лекарственного растительного сырья, в частности монографии на цветки бузины черной, с ЕФ.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: провести сравнительный анализ показателей качества цветков бузины черной, регламентируемых монографией ЕФ «Elder flower» и статьей ГФ XI «Цветки бузины черной» [11], исследовать отечественное растительное сырье — цветки бузины черной на соответствие требованиям данных документов.

При сравнении требований к качеству цветков бузины черной, описанных в ЕФ и ГФ XI, выяснено следующее.

*Описание.* Как в ЕФ, так и в ГФ XI описан только один вид цветков бузины — *Sambucus nigra* L. ГФ XI конкретизирует период сбора и уточняет, что собранные цветки должны быть отделены от цветоносов. Кроме того, ГФ XI допускает сбор бутонов (Табл. 1).

*Макроскопия (Внешние признаки).* В основном этот раздел в ЕФ и в ГФ XI иденти-

Таблица 1

Сравнительные данные по описанию и наличию посторонних примесей в цветках бузины черной по монографии ЕФ и статье ГФ XI

	ЕФ «Elder flower»	ГФ XI «Цветки бузины черной»
<b>описание</b>	Цветки бузины состоят из высушенных цветков <i>Sambucus nigra</i> L. Они содержат не менее 0.80 % флавоноидов, в пересчете на изокверцитрозид ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ; М.м. 464.4) и на сухое сырье.	Собранные в период цветения, высушенные и отделенные от цветоносов цветки и бутоны дикорастущего и культивируемого кустарника бузины черной — <i>Sambucus nigra</i> L., сем. жимолостных — Caprifoliaceae.
<b>макроскопия (внешние признаки)</b>	Цветки около 5 мм в диаметре, имеют три небольших прицветника (видимые под лупой) и могут иметь цветоножку. Пятизубчатая чашечка небольших размеров; венчик светло-желтый с пятью широко овальными лепестками, сросшимися у основания в трубку. Нити пяти желтых тычинок чередуются с лепестками. Венчик часто отделен или прикреплен к тычинкам, с которыми он сросся у основания. Нижняя завязь трехгнездная, с коротким столбиком и тремя тупыми рыльцами.	Отдельные цветки и бутоны на коротких голых цветоножках или без них. Цветки со слабо заметной пятизубчатой спайнолистной чашечкой и венчиком из 4—5 лепестков, сросшихся у основания, диаметром до 5 мм. Тычинок 5, приросших к трубке венчика, завязь полунижняя, трехгнездная. Цвет желтоватый. Запах ароматный. Вкус пряный.
<b>микроскопия</b>	Сырье измельчают в порошок (355). Порошок зеленовато-желтого цвета. Просматривают под микроскопом, используя <i>раствор хлоральгидрата Р</i> . В порошке видны многочисленные сферические, иногда эллипсоидные зерна пыльцы около 30 мкм в диаметре с тремя зачаточными порами и очень мелкоямчатой экзиной; клетки эпидермы чашечки с волнистой кутикулой и иногда одноклеточный краевой зубчик основания; фрагменты венчика с многочисленными маленькими капельками эфирного масла, клетки верхней эпидермы имеют слегка утолщенные четко видные стенки и бороздчатую кутикулу; клетки мезофилла лепестков и чашелистиков с идиобластами, содержащими многочисленные красноватые кристаллы кальция оксалата.	При рассмотрении лепестка с поверхности видны многоугольные со слабо извилистыми тонкими стенками клетки верхнего эпидермиса, по краю — с сосочковидными выростами; клетки нижнего эпидермиса более крупные, сильно извилистые. Устьица только на нижней стороне лепестка, аномоцитного типа. Кутикула с обеих сторон, морщинистая. Клетки эпидермиса чашелистика со слабо извилистыми стенками, устьица округлые, кутикула мелкоморщинистая. Волоски простые и головчатые. Простые волоски мелкие, одноклеточные, тонкостенные, со штриховатой кутикулой, головчатые волоски крупные, с округлой или овальной многоклеточной головкой на многоклеточной ножке.

чен. Основное отличие в том, что ЕФ допускает наличие у цветков цветоножки.

**Микроскопия.** В ЕФ существенных отличий от ГФ XI не имеется. Однако некоторые различия наблюдаются. В первую очередь, это проведение эксперимента: в ЕФ исследования проводят на измельченном порошке цветков, а в ГФ XI — на микропрепаратах цветка. В ЕФ при данном исследовании больше внимания уделяется различным включениям (зерна пыльцы, капельки эфирного масла, идиобласты, кристаллы кальция оксалата), в ГФ XI — характерным фрагментам лепестка, чашелистика, волосков.

**Идентификация. Метод тонкослойной хроматографии (Качественные реакции).** В ГФ XI какие-либо методики идентификации отсутствуют. В ЕФ идентификация проводится методом тонкослойной хроматографии (2.2.27). Приведен полный хроматогра-

фический профиль испытуемого раствора, полученный в условиях определения и состоящий из флавоноидов (изокверцитрин, рутин), фенилкарбоновых кислот (хлорогеновая кислота), а также близлежащих и родственных соединений. (Табл. 2). В дневном свете хорошо должны быть видны только зоны, соответствующие рутину и изокверцитрину.

**Посторонние примеси.** ЕФ не допускает содержание бузины травянистой (*S. ebulus*). Определение проводят методом ТСХ. При этом на хроматографическом профиле не должна обнаруживаться зона оранжевой флюоресценции, расположенная ниже зоны рутина.

Монографиями ЕФ и ГФ XI регламентируется содержание побуревших цветков (15 % и 8 %, соответственно). ЕФ допускает содержание фрагментов крупных цветоножек,



Таблица 2

Сравнительные данные по идентификации (метод ТСХ), посторонним примесям, числовым показателям и количественному определению цветков бузины черной по монографии ЕФ и статье ГФ XI

	ЕФ «Elder flower»	ГФ XI «Цветки бузины черной»
ТСХ	Пересматривают хроматограммы, полученные в испытании «Sambucus ebulus», в УФ-свете при длине волны 365 нм. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: интенсивная зона светло-голубой флуоресценции, соответствующая кислоте хлорогеновой, зона оранжевой флуоресценции, соответствующая рутину, зона оранжевой флуоресценции, соответствующая изокверцитрину. Эти зоны должны быть светлее зоны, соответствующей гиперозиду на хроматограмме раствора сравнения. Зона зеленовато-синей флуоресценции на хроматограмме испытуемого раствора должна быть расположена немного ниже зоны, соответствующей кислоте кофейной на хроматограмме раствора сравнения. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться дополнительные зоны слабой флуоресценции. При просмотре при дневном свете на хроматограмме испытуемого раствора должны четко обнаруживаться только зоны оранжевой флуоресценции, соответствующие рутину и изокверцитрозиду	
<b>посторонние примеси</b>	<i>Sambucus ebulus</i> L. На хроматограмме испытуемого раствора не должна обнаруживаться розовая зона, расположенная ниже зоны рутин на хроматограмме раствора сравнения.	
побуревших цветков	не более 15 %	не более 8 %
фрагментов крупных цветоножек и других примесей	не более 8 %	
других частей растения (цветоножек, веточек, соцветий и листьев)		не более 10 %
измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм		не более 8 %
органической примеси		не более 1 %
минеральной примеси		не более 1 %
<b>общая зола</b>	не более 10.0 %	не более 10 %
<b>влажность (потеря в массе при высушивании)</b>	не более 10.0 %	не более 14 %
<b>количественное определение</b>	0.80 % флавоноидов, в пересчете на изокверцитрозид	

органической и минеральной примесей — не более 8 %, ГФ XI дополнительно регламентирует количество других частей растения — не более 10 %, минеральной (1 %) и органической (1 %) примесей (Табл. 2).

Как в ЕФ, так и в ГФ XI приведены показатели «Общая зола», «Потеря в массе при высушивании», однако нормирование разное.

**Количественное определение.** В ГФ XI данный раздел отсутствует. ЕФ регламентирует содержание флавоноидов, в пересчете на изокверцитрин (изокверцитрозид), не менее 0.8 %.

Таким образом, сравнительный анализ монографий показал, что существенных отличий в монографии ЕФ и в статье ГФ XI нет. Наличие в монографии ЕФ таких показателей качества как идентификация, посторонние примеси (методом ТСХ) и количественное определение дает несомненное право на включение монографии ЕФ в национальную Фармакопею.

В качестве объектов исследования были использованы образцы цветков бузины черной собранные в 2003-2004 годах Симферопольской (1), Кировоградской (2), Винницкой (3) областях.

Таблица 3

## Результаты анализа образцов цветков бузины черной в соответствии с требованиями ГФ XI

Показатели	Нормирование	1	2	3
описание		+	+	+
внешние признаки		+	+	+
микроскопия		+	+	+
побуревших цветков	не более 8%	33	5	12
других частей растения (цветоножек, веточек, соцветий и листьев)	не более 10%	6	3.5	9
измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм	не более 8%	4	9	6
органической примеси	не более 1 %	0.2	0.1	0,8
минеральной примеси	не более 1 %	-	-	-
влажность	не более 14 %	7.0	7.3	6.95
общая зола	не более 10 %	7.6	8.4	8.0

Товароведческий (отбор проб, содержание примесей, степень измельчения, поражение амбарными вредителями, содержание влаги и золы), макроскопический, микроскопический анализ проводили в соответствии с требованиями ГФ XI, ГОСТ [12], фитохимический анализ — по методикам, описанными в ЕФ и ГФ XI [3, 11].

Результаты анализа образцов цветков бузины черной в соответствии с требованиями ГФ XI представлены в Табл. 3. Все проанализированные образцы удовлетворяли требованиям данной статьи по всем показателям, за исключением наличия побуревших цветков в образцах **1** и **2**.

При проведении макроскопических и микроскопических исследований во всех образцах были обнаружены характерные диагностические признаки. Исследования проводили аналогично [1].

При проведении исследований, связанных с идентификацией сырья по методике ТСХ,

описанной в ЕФ, были использованы хроматографические пластинки «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ, ПТСХ-АФ-В-УФ и «Silica gel 60 F254» фирмы «Merck». На пластинах отмечалось хорошее разделение веществ, входящих в состав раствора сравнения, а также разделение компонентов испытуемого раствора [1].

По показателю «Посторонние примеси» все проанализированные образцы соответствовали требованиям ЕФ.

В монографии ЕФ на цветки бузины приводится методика количественного определения суммы флавоноидов, в пересчете на изокверцитрин (не менее 0.8 %).

Методика определения флавоноидов заключается в следующем: сначала проводится кислотный гидролиз сырья в среде ацетона при нагревании, затем с аликвотой полученного раствора проводят экстракцию этилацетатом, а с аликвотой этилацетатного экстракта проводят реакцию с раствором хлорида

Таблица 4

## Результаты анализа образцов цветков бузины черной в соответствии с требованиями ЕФ

Показатели	Нормирование	1	2	3
описание		+	+	+
макроскопия		+	+	+
микроскопия		+	+	+
ТСХ		+	+	+
посторонние примеси	<i>Sambucus ebulus</i> L.	+	+	+
потеря в массе при высушивании	не более 10.0 %	7.0	7.3	6,95
побуревших цветков	не более 15 %	33	5	12
фрагментов крупных цветоножек и других посторонних примесей	не более 8 %	6.2	3.6	9.8
общая зола	не более 10.0 %	7.6	8.4	8.0
количественное определение	не менее 0.80 % флавоноидов, в пересчете на изокверцитрозид	1.036	0833	0.989

алюминия, получая окрашенные комплексы. Измеряют оптическую плотность окрашенных растворов при длине волны 425 нм. Расчет количественного содержания проводят, используя значение удельного показателя поглощения изокверцитрина, который при измеряемой длине волны равен 500.

Как видно из Табл. 4, все проанализированные образцы цветков бузины удовлетворяют требованиям ЕФ по количественному содержанию суммы флавоноидов, в пересчете на изокверцитрин.

**Выводы**

1. Проведенный сравнительный анализ показателей качества цветков бузины в соответствии с требованиями ЕФ и ГФ XI показал, что в анализируемых статьях набор показателей качества отличается. Наличие в монографии ЕФ таких показателей как идентификация и посторонние примеси (методом ТСХ), а также количественного определения флавоноидов предполагают принятие статьи ЕФ к включению в ГФУ.

2. Проведенные исследования показали, что по **всем** показателям качества отечественное лекарственное растительное сырье, имеющееся в нашем распоряжении, соответствует требованиям ЕФ. Фенольный состав проанализированных образцов по методике ТСХ соответствует требованиям ЕФ, а содержание флавоноидов в исследуемых образцах колеблется от 0.83 % до 1.04 %).

3. При введении в ГФУ монографии ЕФ на цветки бузины в национальную часть нет необходимости включать национальные требования.

*Для окончательного решения вопроса о соответствии данного вида сырья требованиям ЕФ необходимы непосредственное участие всех заинтересованных лиц в обсуждении данной проблемы и предоставление образцов сырья для анализа.*

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Плоды боярышника» / Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Товмасын Е.К., Хованская Н.П., Воловик В.Г., Георгиевский В.П. // Фармаком. — 2004. - № 4. - С. 27-35.
2. Котов А.Г., Котова Э.Э., Хованская Н.П. Стандартизация плодов боярышника и лекарственных препаратов на их основе по показателю «Количественное определение» // Фармаком. — 2004. - № 4. — С. 35-42.
3. European Pharmacopoeia. - 4<sup>th</sup> ed. - Strasbourg: Council of Europe, 2002. — 2416 p.
4. Лекарственные растения Украины / Ивашин Д.С., Катина З.Ф., Рыбачук И.З., Иванов В.С., Бутенко Л.Т. - Киев: Урожай, 1975. - 360 с.

5. WHO monographs on selected medicinal plants. — Geneva: World Health Organization, 2002. — Vol. 2. — 357 p.
6. Ковальов В.М., Павлій О.І., Усакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин. - Харків: «Прапор», 2000. - 740 с.
7. Растения для нас / Под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой. - Санкт-Петербург: Учебная книга, 1996. - 654 с.
8. Procédé de purification d'un extrait de fruit rouge contenant des antocyanosides extrait obtenu par le procédé et utilisation dudit extrait / Заявка 2789684. Франция, МПК<sup>7</sup> С 07 Н 17/065, С 09 В 61/00 / Sailier Chryste, Dufour Dominique; FERLUXSA. — No. 9901959; Заявл. 15.02.99; Опубл. 18.08.2000.
9. Holunderblüten // DAB 10. — 2. Nachtrag, 1993.
10. Pharmacopoea Helvetica. - 8<sup>th</sup> ed. — Berne: Departement federal de l'interieur, 1997.
11. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с.
12. Лекарственное растительное сырье. — М.: Изд-во стандартов, 1980. — С. 27-30.

**Резюме**

Котов А.Г., Котова Е.Е., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.

**Питання введення у Державну Фармакопею України монографії «Бузини квітки»**

Проведено порівняльний аналіз показників якості квіток бузини, що регламентуються ЄФ і ГФ XI. Більш повний набір показників припускає прийняття монографії ЄФ до введення в ДФУ. Показано, що за всіма показниками якості вітчизняна лікарська рослина сировина відповідає вимогам ЄФ.

**Summary**

Kotov A.G., Kotova E.E., Tikhonenko T.M., Volovic V.G.

**Matters of «Elder flower» monograph introduction to the State Pharmacopoeia of Ukraine**

The comparative analysis of elder flower quality indices, regulated by EP and SP XI, was conducted. More clear set of indices rates accept of EP monograph for introduction to SPU expected. It was shown that domestic herbal drugs by all quality indices satisfied EP requirements.

**Котов Андрей Георгиевич** (р. 1960). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1982). Ст. науч. сотр. сектора природных гетероциклических соединений ГП ГНЦЛС (2001). К.фарм.н. (1996). Ст. науч.сотр. (2004).

**Котова Элина Эдуардовна.** Окончила Харьковский государственный университет (1983). Мл. науч.сотр. лаборатории фармакопейного анализа ГП НЭФЦ.

**Тихоненко Татьяна Михайловна.** Окончила Харьковский государственный университет (1989) и Национальную фармацевтическую академию Украины. Работает в ГП НЭФЦ (с 1997). Науч. сотр. группы «Монографии на лекарственные субстанции» отдела ГФУ ГП НЭФЦ.

**Воловик Виктор Григорьевич.** Окончил Харьковский государственный университет. Науч. сотр. сектора химии и технологии фенольных препаратов ГП ГНЦЛС.

## ПРОЕКТ

## БУЗИНИ КВІТКИ

Sambuci flos

## ELDER FLOWER

Висушені квітки *Sambucus nigra* L. Містять не менше 0.80 % флавоноїдів, у перерахунку на ізокверцитрозид ( $C_{11}H_{20}O_{12}$ ; М.м. 464.4) і суху сировину.

## ВЛАСТИВОСТІ

Сировина має витримувати вимоги щодо макроскопії та мікроскопії, зазначені у випробуваннях А та В розділу «Ідентифікація».

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Квітка близько 5 мм у діаметрі, має три невеликі приквітки (що видимі під лупою) і може мати квітконіжку. П'ятизубчаста чашечка невеликих розмірів; віночок світло-жовтий із п'ятьма широко овальними пелюстками, що зрослися при основі у трубку. Нитки п'яти жовтих тичинок чергуються з пелюстками. Віночок часто відділений або прикріплений до тичинок, із якими він зрісся при основі. Нижня зав'язь тригніздна, з коротким стовпчиком і трьома тупими приймочками.

**В.** Сировину подрібнюють на порошок (355). Порошок зеленувато-жовтого кольору. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгірату Р. Видимі численні сферичні, іноді еліпсоїдні зерна пилку близько 30 мкм у діаметрі із трьома зачатковими порами та дуже дрібноямчатою екзиною; клітини епідерми чашечки із хвилястою кутикулою та іноді одноклітинний крайній зубчик основи; фрагменти віночка з численними маленькими крапельками ефірної олії, клітини верхньої епідерми мають дещо потовщені чітко видимі стінки та борозенчасту кутикулу; клітини мезофілу пелюстків і чашолистків з ідіобластами, що містять численні червонясті кристали кальцію оксалату.

**С.** Переглядають хроматограми, одержані у випробуванні «*Sambucus ebulus*», в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися: інтенсивна зона світло-блакитної флуоресценції, відповідна кислоті хлорогеновій, зона оранжевої флуоресценції, відповідна рутину,

зона оранжевої флуоресценції, відповідна ізокверцитрину. Ці зони мають бути світлішими за зону, відповідну гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння. Зона зеленувато-синьої флуоресценції на хроматограмі випробовуваного розчину має бути розташована дещо нижче зони, що відповідає кислоті кофейній на хроматограмі розчину порівняння. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися додаткові зони слабкої флуоресценції. При перегляді при денному світлі на хроматограмі випробовуваного розчину мають чітко виявлятися тільки зони оранжевої флуоресценції, відповідні рутину та ізокверцитрозиду.

## ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 8 % фрагментів крупних квітконіжок та інших сторонніх домішок; не більше 15 % квіток, що змінили колір, побурілих. Визначення проводять із 10 г сировини.

***Sambucus ebulus* L.** Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії, використовуючи як тонкий шар підхожий силкагель.

**Випробовуваний розчин.** До 0.5 г здрібненої на порошок сировини (355) додають 10 мл метанолу Р, при постійному струшуванні нагрівають у водяній бані при температурі 65 °С протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують. Одержаний фільтрат доводять метанолом Р до об'єму 10 мл.

**Розчин порівняння.** 1 мг кислоти кофейної Р, 1 мг кислоти хлорогенової Р, 2.5 мг гіперозиду Р і 2.5 мг рутину Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

На лінію старту хроматографічної пластинки окремо, смугами, наносять 10 мкл випробовуваного розчину, 10 мкл (1 мкг кислоти кофейної, 1 мкг кислоти хлорогенової, 2.5 мкг гіперозиду, 2.5 мкг рутину) випробовуваного розчину. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників кислота мурашина безводна Р — вода Р — метилетилкетон Р — етилацетат Р (10:10:30:50). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать при температурі від 100 °С до 105 °С і гарячу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р. Потім пластинку обприскують розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, су-

шать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

На хроматограмі розчину порівняння у нижній частині, за зростанням  $R_f$ , мають виявлятися: зона оранжевої флуоресценції, відповідна рутину, зона світло-блакитної флуоресценції, відповідна кислоті хлорогеновій, та зона від оранжево-жовтої до оранжево-коричневої флуоресценції, відповідна гіперозиду. У верхній третині хроматограми має виявлятися зона зеленувато-синьої флуоресценції, відповідна кислоті кофейній.

На хроматограмі випробовуваного розчину не має виявлятися рожева зона нижче зони, відповідній рутину на хроматограмі розчину порівняння.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 10.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 10.0 %.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

**Вихідний розчин.** 0.600 г здрібненої на порошок сировини (355) поміщають у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додають 1 мл розчину 5 г/л *гексаметилентетраміну Р*, 20 мл *ацетону Р* і 2 мл *кислоти хлористоводневої Р1*. Одержану суміш кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв і фільтрують крізь тампон із вати у колбу. Додають тампон із вати до залишку у круглодонну колбу й екстрагують двома порціями, по 20 мл кожна, *ацетону Р*, кожний раз проводячи кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 10 хв, і охолоджують. Кожний екстракт фільтрують крізь тампон із вати у колбу. Після охолодження об'єднані ацетонові екстракти фільтрують крізь паперовий фільтр у

мірну колбу та доводять об'єм розчину *ацетоном Р* до 100.0 мл, обполіскуючи колбу і паперовий фільтр. 20.0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну лійку додають 20 мл *води Р* і струшують із однією порцією 15 мл, потім із трьома порціями, по 10 мл кожна, *етилацетату Р*. Одержані етилацетатні екстракти об'єднують у ділильній лійці, промивають двома порціями, по 50 мл кожна, *води Р*, фільтрують над 10 г *натрію сульфату безводного Р* у мірну колбу і доводять об'єм фільтрату *етилацетатом Р* до 50.0 мл.

**Випробовуваний розчин.** До 10.0 мл вихідного розчину додають 1 мл *реактиву алюмінію хлориду Р* і доводять об'єм розчину розчином 5 % (об/об) *кислоти оцтової льодяної Р* у *метанолі Р* до 25.0 мл.

**Компенсаційний розчин.** 10.0 мл вихідного розчину доводять розчином 5 % (об/об) *кислоти оцтової льодяної Р* у *метанолі Р* до об'єму 25.0 мл.

Оптичну густину (2.2.25) випробовуваного розчину вимірюють не пізніше ніж через 30 хв після приготування за довжини хвилі 425 нм відносно компенсаційного розчину.

Вміст флавоноїдів, у відсотках, у перерахунку на ізокверцитрозид, обчислюють за формулою:

$$\frac{A \times 1.25}{m}$$

$A$  — оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 425 нм,

$m$  — маса наважки випробовуваної сировини, у грамах.

Використовують питомий показник поглинання ізокверцитрозиду, що дорівнює 500.

#### ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

УДК 615.11:615.322

Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Государственное предприятие «Научно-экспертный фармакопейный центр»

## Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Липы цветки»

Проведен сравнительный анализ показателей качества цветков липы, регламентируемых ЕФ и ГФ XI. Более полный набор показателей предполагает принятие монографии ЕФ к введению в ГФУ. Показано, что по всем показателям качества отечественное лекарственное растительное сырье соответствует требованиям ЕФ.

В предыдущих публикациях [1, 2] нами рассматривался вопрос о возможности гармонизации национальной законодательной базы на лекарственное растительное сырье, стандартизация которого проводится по фенилпропаноидам, с Европейской Фармакопеей [3].

Липа сердцевидная - *Tilia cordata* Mill., сем. липовых — Tiliaceae, листопадное дерево высотой до 28 м со стройным стволом. Листья очередные, с черешками длиной до 8 см и сердцевидной пластинкой до 9 см в диаметре, по краю мелкозубчатые, с оттянуто заостренной верхушкой. Цветки желтовато-белые, пахучие, до 1 см в диаметре, собраны в щитковидные соцветия с продолговатым светло-желтым прицветным листом длиной 3 - 7 см и шириной 1.5 см. Плоды — округлые, войлочно-опушенные орешки до 8 мм в диаметре. Цветет в июне-июле, плоды созревают в августе-сентябре.

Распространена в Европейской части бывшего СССР, в Крыму, на Северном Кавказе, в Закавказье, на Южном Урале (Башкирия, Татария), в Западной Сибири. Размножается семенами. В Украине основные заготовки производят в Хмельницкой, Винницкой, Киевской, Полтавской, Черкасской, Сумской, Харьковской, Донецкой областях. Кроме липы сердцевидной в Украине произрастает также липа широколистная — *Tilia platyphyllos* Scop. и липа пушистая *Tilia tomentosa* Moench. [4].

В цветках липы содержится значительное количество флавоноидных веществ (около 1 %), представленных флавонами, флаванонами, флавонолами. Из флавонов идентифицирован акацетин, акацетина-7-глюкозид (тилианин), из флавонолов - производные кемпферола (тилирозид) и кверцетина, из флаванонов - рутинозид гесперетина. Кроме того, в эфирном масле (0.05 %) содержится фарнезол, отмечается также наличие сапонинов, каротина, кислоты аскорбиновой. Слизистые со-

держат до 40 % урсонных кислот, содержание дубильных веществ — до 2 % [5, 6].

В некоторых Фармакопеях стандартизация цветков липы проводилась дополнительно по показателю набухания с регламентацией от 15 до 32 [7, 8]. Однако, в редакции DAB 10 1996 года монография на цветки липы полностью гармонизирована с ЕФ [9].

Целью настоящей работы является исследование возможности гармонизации национальной законодательной базы (ГФУ) по контролю качества лекарственного растительного сырья, в частности монографии на цветки липы, с ЕФ.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: провести сравнительный анализ показателей качества цветков липы, регламентируемых монографией ЕФ «Lime flower», и статьей ГФ XI «Цветки липы» [10], исследовать отечественное лекарственное растительное сырье - цветки липы на соответствие требованиям данных документов.

При сравнении требований к качеству цветков липы, описанных в ЕФ и ГФ XI, выяснено следующее.

**Описание.** В ГФ XI описано два вида сырья — соцветия *Tilia cordata* Miller, *Tilia platyphyllos* Scop., в ЕФ три вида сырья — соцветия *Tilia cordata* Miller, *Tilia platyphyllos* Scop., *Tilia × vulgaris* Heyne (Табл. 1). *Tilia × vulgaris* Heyne (липа обыкновенная) является родственным видом *Tilia cordata* Miller и *Tilia platyphyllos* Scop.

**Макроскопия (Внешние признаки).** В основном этот раздел в ЕФ и в ГФ XI идентичен. Основное отличие в том, что ГФ XI допускает в сырье наличие бутонов и недозревших плодов. Кроме того, в ГФ XI описывается измельченное сырье.

**Микроскопия.** В ЕФ существенных отличий от ГФ XI не имеется (Табл. 3).

**Идентификация. Метод тонкослойной хроматографии (Качественные реакции).** В

Таблица 1

Сравнительные данные по описанию и макроскопическим характеристикам цветков липы по монографии ЕФ и статье ГФ XI

	ЕФ «Lime flower»	ГФ XI «Цветки липы»
<b>описание</b>	Цельные высушенные соцветия <i>Tilia cordata</i> Millier, <i>Tilia platyphyllos</i> Scop., <i>Tilia × vulgaris</i> Heune или их смесь.	Собранные во время цветения и высушенные соцветия дикорастущих и культивируемых деревьев липы сердцевидной — <i>Tilia cordata</i> Mill. и липы широколистной — <i>Tilia platyphyllos</i> Scop., сем. липовых — Tiliaceae.
<b>макроскопия (Внешние признаки)</b>	Соцветие желтовато-зеленое. Главная ось соцветия несет прицветник в форме язычка, желтовато-зеленый, практически не опушенный, по главной жилке сросшийся почти до половины с цветоножкой. Соцветие обычно состоит из 2-7 цветков, иногда - из 16. Чашелистики немного отделены от околоцветника, длиной до 6 мм, их нижняя поверхность обычно не опушена, верхняя поверхность и края густо опушены. Пять тонких яйцевидных лепестков желтовато-белые, длиной до 8 мм. Они имеют мелкое жилкование, их края иногда покрыты одиночными трихомами. Многочисленные тычинки свободны и обычно сгруппированы в пять пучков. Верхняя завязь имеет пестик с иногда пятилопастным рыльцем.	<i>Цельное сырье.</i> Соцветия щитковидные, состоят из 5-15 (у липы сердцевидной) или 2-9 (у липы широколистной) цветков на удлинённых цветоножках, сидящих на общем цветоносе, сросшемся в нижней части с главной жилкой прицветного листа. Цветки правильные, 1-1.5 см в диаметре. Чашечка из 5 продолговато-яйцевидных чашелистиков, густо опушенных по краю и с внутренней стороны. Венчик из 5 свободных яйцевидных лепестков, длиннее чашечки. Тычинки многочисленные, с 2 желтыми пыльниками на длинных нитях, сросшихся в 5 пучков. Пестик один с верхней шаровидной завязью, густо покрытой пушистыми волосками. Встречаются цветочные бутоны и незрелые плоды — шаровидные сильно опушенные орешки до 2 мм в диаметре. Прицветный лист пленчатый, с густой сетью жилок, длиной до 6 см и шириной до 1.5 см, продолговато-эллиптической формы с притупленной верхушкой, в нижней половине сросшийся по главной жилке с цветоносом. <i>Цвет лепестков беловато-желтый, чашелистиков — зеленовато- или желтовато-серый, прицветных листьев — светло-желтый или зеленовато-желтый. Запах слабый, ароматный. Вкус сладковатый, слегка вязущий, с ощущением слизистости.</i> <i>Измельченное сырье.</i> Смесь цветков, цветоножек и кусочков прицветников различной формы размером от 0.5 до 20 мм. Цвет лепестков беловато-желтый, чашелистиков — зеленовато- или желтовато-серый, прицветных листьев — светло-желтый или зеленовато-желтый. Запах слабый, ароматный. Вкус сладковатый, слегка вязущий, с ощущением слизистости.

ЕФ идентификация проводится методом тонкослойной хроматографии (2.2.27). Приведен полный хроматографический профиль испытуемого раствора, полученный в условиях определения и состоящий из флавоноидов (рутин, гиперозид), фенилкарбоновых кислот (кислота кофейная), а также близлежащих и родственных соединений.

В ГФ XI идентификация проводится качественной реакцией на слизь и флавоноиды (Табл. 3).

*Посторонние примеси.* ЕФ ограничивает содержания двух видов соцветий липы (*Tilia americana* L., *Tilia tomentosa* Moench), кроме того, монографией ЕФ регламентируется 2 % примесей (минеральной и органической). ГФ XI в цельном сырье регламентирует содержание восьми различных типов примесей (в сумме 27.4 %) (Табл. 4).

Как в ЕФ, так и в ГФ XI приведен показатель «Потеря в массе при высушивании», однако нормирование разное.

ЕФ дополнительно регламентирует содержание общей золы.

*Количественное определение.* Данный раздел отсутствует как в ЕФ так и в ГФ XI.

Таким образом, сравнительный анализ монографий показал, что существенных отличий в разделах как монографии ЕФ, так и статьи ГФ XI нет. Наличие такого показателя качества в монографии ЕФ, как идентификация методом ТСХ дает несомненное право на включение монографии ЕФ в национальную Фармакопею.

В качестве объектов исследования были использованы образцы цветков липы, собранные в 2003-2004 годах в Тернопольской (1), Винницкой (2), Харьковской (3) областях. Товароведческий (отбор проб, содержание примесей, степень измельчения, поражение амбарными вредителями, содержание влаги и золы), макроскопический, микроскопический анализ проводили в соответствии с требованиями ГФ XI, ГОСТ [11], фитохимический анализ — по методикам, описанными в ЕФ и ГФ XI [3, 10].

Результаты анализа образцов липы в соответствии с требованиями ГФ XI представле-

Таблица 2

## Сравнительные данные по микроскопическим характеристикам цветков липы по монографии ЕФ и статье ГФ XI

	ЕФ «Lime flower»	ГФ XI «Цветки липы»
микроскопия	<p>Разделяют соцветия на отдельные части. Просматривают под микроскопом, используя <i>раствор хлоральгидрата Р</i>. Клетки верхнего эпидермиса прицветника с прямыми или немного извилистыми антиклинальными стенками; клетки нижнего эпидермиса с волнистыми антиклинальными стенками и устьичным комплексом аномоцитного типа (2.8.3). Отдельные клетки мезофилла содержат небольшие пучки кристаллов кальция оксалата. В паренхиме чашелистиков, особенно возле жилок, видны многочисленные слизистые клетки и клетки, содержащие небольшие пучки кальция оксалата. Верхний эпидермис чашелистиков изогнут, тонкостенный, покрытый одноклеточными или звездчатыми, состоящими из до 5 клеток, трихомами. Клетки эпидермиса лепестков с прямыми антиклинальными стенками, бороздчатой кутикулой, без устьиц. В паренхиме лепестков видны небольшие пучки кальция оксалата, особенно в их заостренной части видны слизистые клетки. Зерна пыльцы около 30-49 мкм в диаметре, овальные или почти треугольные, с тремя зачаточными порами и мелко зернистой экзиной. Завязь не опушена или густо покрыта трихомами, часто очень закрученными, одноклеточными или 2-4 лучистыми звездчатыми.</p>	<p>При рассмотрении прицветного листа с поверхности видны слегка извилистые клетки эпидермиса с обеих сторон листа. Устьица только на нижней стороне, овальные, с 4-6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). Волоски встречаются преимущественно в средней части прицветного листа, вблизи места срастания его с цветоносом. Волоски двух типов: головчатые — с многоклеточной овальной головкой на короткой 1-3-клеточной ножке и звездчато-лучистые, состоящие из 3-7 длинных извилистых клеток, сросшихся основаниями. Мезофилл очень рыхлый, типа аэренхимы, с друзами, реже призматическими кристаллами оксалата кальция, особенно многочисленными вблизи жилок. Лепестки и чашелистики характеризуются наличием друз оксалата кальция и таких же волосков, как и на прицветном листе. Кроме того, у основания чашелистиков, с внутренней стороны, расположены длинные прямые волоски, состоящие из двух параллельных клеток, сросшихся основаниями, на лепестках — вильчатые волоски из двух извилистых клеток, сросшихся основанием. В лепестках хорошо видны крупные вместилища со слизью.</p>

Таблица 3

## Сравнительные данные по идентификации цветков липы по монографии ЕФ и статье ГФ XI

	ЕФ «Lime flower»	ГФ XI «Цветки липы»
ТСХ	<p>На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться основная зона с от коричневато-желтой до оранжевой флуоресценцией. Эта зона должна быть расположена точно выше зоны гиперозида на хроматограмме раствора сравнения. При просмотре при дневном свете эта зона обнаруживается отдельно от других зон как основная зона. По значению <math>R_f</math> эта зона коричневато-желтой флуоресценции соответствует также рутину. Ниже этой зоны должны обнаруживаться две зоны желтой флуоресценции. Между зонами рутин и гиперозида обнаруживаются зоны оранжевой и желтой флуоресценции. Между зонами гиперозида и кислоты кофейной должно обнаруживаться до пяти зон от желтой до оранжевой флуоресценции. Непосредственно ниже зоны кислоты кофейной должна обнаруживаться зона синей флуоресценции.</p>	
качественные реакции		<p>При смачивании измельченного сырья водой через 3—5 мин частицы сырья покрываются слизью. При смачивании измельченного сырья 5 % раствором аммиака появляется интенсивно желтое окрашивание (флавоноиды).</p>



Таблица 4

Сравнительные данные по посторонним примесям, числовым показателям цветков липы по монографии ЕФ и статье ГФ XI

Показатели	ЕФ «Lime flower»	ГФ XI «Цветки липы»
<b>посторонние примеси</b>	Сырье не должно содержать соцветий с прицветником имеющим на нижней поверхности 5-8 лучистые звездчатые трихомы; с цветками, имеющими очевидно двойной венчик, образованный преобразованием пяти тычинок в стаминоиды лепесткового типа, с недольчатым или незубчатым пестиком. 6-лепестковые цветки должны обнаруживаться лишь изредка ( <i>Tilia americana</i> L., <i>Tilia tomentosa</i> Moench). Определение проводят из 30 г сырья.	
органической примеси	не более 2 % (все примеси)	не более 0.3 %
минеральной примеси		не более 0.1 %
соцветий с прицветниками и отдельных прицветников, поврежденных вредителями и пораженных ржавчиной		не более 2 %
побуревших и потемневших частей соцветия		не более 4%
других частей липы (листьев и побегов)		не более 1 %
соцветий полностью отцветших, с плодами		не более 2 %
измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм		не более 3 %
осыпи отдельных цветков или соцветий без прицветников		не более 15 %
<b>влажность (потеря в массе при высушивании)</b>	не более 12 %	не более 13%
<b>общая зола</b>	не более 8.0 %	

ны в Табл. 6. Все проанализированные образцы удовлетворяли требованиям данной статьи по всем показателям.

При проведении микроскопических исследований во всех образцах были обнаружены характерные диагностические признаки. Исследования проводили аналогично [1].

При проведении исследований, связанных с идентификацией сырья по методике ТСХ, описанной в ЕФ, были использованы хроматографические пластинки «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ, ПТСХ-АФ-В-УФ и «Silica gel 60 F254» фирмы «Merck». На пластинах отмечалось хорошее разделение веществ, входящих в состав раствора сравнения, а также разделение компонентов испытуемого раствора.

По показателю «Посторонние примеси» все проанализированные образцы соответствовали требованиям ЕФ.

Таким образом, проанализированные образцы цветков липы удовлетворяли требованиям ЕФ по всем показателям.

### Выводы

1. Сравнительный анализ показателей качества цветков липы, проведенный в соответствии с требованиями ЕФ и ГФ XI, показал, что в анализируемых статьях набор показателей качества существенно не отличается. Наличие в монографии ЕФ такого показателя как идентификация методом ТСХ, предполагает принятие статьи ЕФ к включению в ГФУ.

2. Проведенные исследования показали, что по **всем** показателям качества отечественное лекарственное растительное сырье, имеющееся в нашем распоряжении, соответствует требованиям ЕФ. Фенольный состав проанализированных образцов по методике ТСХ соответствует требованиям ЕФ.

3. При введении в ГФУ монографии ЕФ на цветки липы нет необходимости включать национальные требования.

*Для окончательного решения вопроса о соответствии данного вида сырья требовани-*

Таблица 5

## Результаты анализа образцов цветков липы (цельное сырье) в соответствии с требованиями ГФ XI

Показатели	Нормирование	1	2	3
описание		+	+	+
внешние признаки		+	+	+
микроскопия		+	+	+
цветные реакции	слизи, флавоноиды	+	+	+
влажность	не более 13%	9.86	10.2	11.1
соцветий с прицветниками и отдельных прицветников, поврежденных вредителями и пораженных ржавчиной	не более 2 %	не обн.	не обн.	не обн.
побуревших и потемневших частей соцветия	не более 4 %	не обн.	не обн.	0.2
других частей липы (листьев и побегов)	не более 1 %	0.1	0.15	0.4
соцветий полностью отцветших, с плодами	не более 2 %	не обн.	не обн.	не обн.
измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм	не более 3 %	2.1	1.4	0.5
осыпи отдельных цветков или соцветий без прицветников	не более 15 %	4.0	2.6	4.0
органической примеси	не более 0.3 %	не обн.	не обн.	не обн.
минеральной примеси	не более 0.1 %	не обн.	не обн.	не обн.

Таблица 6

## Результаты анализа образцов цветков липы в соответствии с требованиями ЕФ

Показатели	Нормирование	1	2	3
описание		+	+	+
внешние признаки		+	+	+
микроскопия		+	+	+
ТСХ		+	+	+
посторонние примеси	( <i>Tilia americana</i> L., <i>Tilia tomentosa</i> Moench).	не обн.	не обн.	не обн.
потеря в массе при высушивании	не более 12 %	9.86	10.2	11.1
посторонние примеси	не более 2 %	0.1	0.15	0.6
общая зола	8 %	6.5	7.2	7.0

ям ЕФ необходимы непосредственное участие всех заинтересованных лиц в обсуждении данной проблемы и предоставление образцов сырья для анализа.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Плоды боярышника» / Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Товмасын Е.К., Хованская Н.П., Воловик В.Г., Георгиевский В.П. // Фармаком. — 2004. - № 4. - С. 27-35.
2. Котов А.Г., Котова Э.Э., Хованская Н.П. Стандартизация плодов боярышника и лекарственных препаратов на их основе по показателю «Количественное определение» // Фармаком. — 2004. - № 4. — С. 35-42.
3. European Pharmacopoeia. - 4<sup>th</sup> ed. - Strasbourg: Council of Europe, 2002. — 2416 p.
4. Лекарственные растения Украины / Ивашин Д.С., Катина З.Ф., Рыбачук И.З., Иванов В.С., Бутенко Л.Т. - Киев: Урожай, 1975. - 360 с.
5. Ковальов В.М., Павлій О.І., Усакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин. - Харків: «Прапор», 2000. - 740 с.
6. Растения для нас / Под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой. - Санкт-Петербург: Учебная книга, 1996. - 654 с.
7. Pharmacopoea helvetica. — 8<sup>th</sup> ed. — Berne: Departement federal de l'interieur, 1997.

8. Lindenblüten // DAB 10. - Grundlfg., 1991.

9. Lindenblüten // DAB 10. - 1996.

10. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с.

11. Лекарственное растительное сырье. — М.: Изд-во стандартов, 1980. — 296 с.

## Резюме

Котов А.Г., Котова Е.Е., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г.

## Питання введення у Державну Фармакопею України монографії «Липи квітки»

Проведено порівняльний аналіз показників якості квіток липи, що регламентуються ЄФ і ГФ XI. Більш повний набір показників припускає прийняття монографії ЄФ до введення в ДФУ. Показано, що за всіма показниками якості вітчизняна лікарська рослина сировина відповідає вимогам ЄФ.

## Summary

Kotov A.G., Kotova E.E., Tikhonenko T.M., Volovic V.G.

## Matters of «Lime flower» monograph introduction to the State Pharmacopoeia of Ukraine

The comparative analysis of lime flower quality indicators, regulated by EP and SP XI, was conducted. More clear

set of indices rates accept of EP monograph for introduction to SPU expected. It was shown that domestic herbal drugs by all quality indices satisfied EP requirements.

**Котов Андрей Георгиевич** (р. 1960). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1982). Ст. науч. сотр. сектора природных гетероциклических соединений ГП ГНЦЛС (2001). К.фарм.н. (1996). Ст. науч.сотр. (2004).

**Котова Элина Эдуардовна.** Окончила Харьковский государственный университет (1983). Мл. науч.сотр. лаборатории фармакопейного анализа ГП НЭФЦ.

**Тихоненко Татьяна Михайловна.** Окончила Харьковский государственный университет (1989) и Национальную фармацевтическую академию Украины. Работает в ГП НЭФЦ (с 1997). Науч. сотр. группы «Монографии на лекарственные субстанции» отдела ГФУ ГП НЭФЦ.

**Воловик Виктор Григорьевич.** Окончил Харьковский государственный университет. Науч. сотр. сектора химии и технологии фенольных препаратов ГП ГНЦЛС.

## ПРОЕКТ

## ЛИПИ КВІТКИ

Tiliae flos

## LIME FLOWER

Цілі висушені суцвіття *Tilia cordata* Millier, *Tilia platyphyllos* Scop., *Tilia × vulgaris* Heyne або їх суміш.

## ВЛАСТИВОСТІ

Квітки липи мають слабкий ароматний запах, солодкі та слизуваті на смак.

Сировина має витримувати вимоги щодо макроскопії та мікроскопії, зазначені у випробуваннях А та В розділу «Ідентифікація».

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ

**А.** Суцвіття жовтувато-зелене. Головна вісь суцвіття несе приквітку у форму язичка, жовтувато-зелену, практично не опушену, що по головній жилці зрослася близько до половини із квітконіжкою. Суцвіття звичайно складається із 2-7 квіток, іноді — із 16. Чашолистки дещо відділені від оцвіттини, завдовжки до 6 мм, їх нижня поверхня звичайно не опушена, верхня поверхня та краї густо опушені. П'ять тонких яйцеподібних пелюсток жовтувато-білі, завдовжки до 8 мм. Вони мають дрібне жилкування, їх краї іноді вкриті поодинокими трихомами. Численні тичинки вільні та звичайно згруповані у п'ять пучків. Верхня зав'язь має маточку з іноді п'ятилопатевою приймочкою.

**В.** Розділяють суцвіття на окремі частини. Переглядають під мікроскопом, використовуючи розчин хлоральгідрату Р. Клітини верхнього епідермісу приквітки із прямими або дещо звивистими антиклінальними стінками; клітини нижнього епідермісу із хвилястими антиклінальними стінками та продиховими комплексами аномоцитного типу (2.8.3). Окремі клітини мезофілу містять невеликі пучки кристалів кальцію оксалату. У паренхімі чашолистків, особливо біля жилок, видимі численні слизові клітини та клітини, що містять невеликі пучки кальцію оксалату. Верхній епідерміс чашолистків зігнутий, тонкостінний, вкритий одноклітинними або зірчастими, що складаються із до 5 клітин, трихомами. Клітини епідермісу пелюсток ма-

ють прямі антиклінальні стінки із борозенчатою кутикулою без продихів. У паренхімі пелюсток видимі невеликі пучки кальцію оксалату, особливо в їх загостреній частині видимі слизові клітини. Зерна пилку близько 30-49 мкм у діаметрі, овальні або майже трикутні із трьома зачатковими порами та дрібно зернистою екзиною. Зав'язь не опушена або густо вкрита трихомами, часто дуже закрученими, одноклітинними або 2-4 променистими зірчастими.

**С.** Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії, використовуючи як тонкий шар підхожий силікагель.

*Випробовуваний розчин.* 1.0 г здрібненої на порошок сировини (355) струшують із 10 мл метанолу Р у водяній бані при температурі 65 °С протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують.

*Розчин порівняння.* 2.0 мг кислоти кофейної Р, 5 мг гіперозиду Р, 5 мг рутину Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

На лінію старту хроматографічної пластинки окремо, смугами, наносять 10 мкл випробовуваного розчину, 10 мкл (2 мкг кислоти кофейної, 5 мкг гіперозиду, 5 мкг рутину). Пластинку поміщають у камеру із сумішню розчинників кислота мурашина безводна Р — вода Р — метилетилкетон Р — етилацетат Р (10:10:30:50). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать при температурі від 100 °С до 105 °С і гарячу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р. Потім пластинку обприскують розчином 50 г/л макрополу 400 Р у метанолі Р, сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

На хроматограмі розчину порівняння, за зростанням  $R_f$ , мають виявлятися: зони, відповідні рутину та гіперозиду, із від жовтувато-оранжевої до коричнювато-оранжевої флуоресценцією; зона, відповідна кислоті кофейній, із зеленувато-синьою флуоресценцією.

На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися основна зона із від коричнювато-жовтої до оранжевої флуоресценцією. Ця зона має бути розташована точно вище зони гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння. При перегляді при денному світлі ця зона виявляється окремо від інших зон як

основна зона. За значенням  $R_f$  ця зона коричнювато-жовтої флуоресценції відповідає також рутину. Нижче цієї зони мають виявлятися дві зони жовтої флуоресценції. Між зонами рутину та гіперозиду виявляються зони оранжевої та жовтої флуоресценції. Між зонами гіперозиду та кислоти кофейної має виявлятися до п'яти зон від жовтої до оранжевої флуоресценції. Безпосередньо нижче зони кислоти кофейної має виявлятися зона синьої флуоресценції.

**Сторонні домішки (2.8.2).** Не більше 2 %. Сировина не має містити суцвіть із приквітком, що має на нижній поверхні 5-8 променисті зірчасті трихоми; із квітками, що мають очевидно подвійний віночок через перетворен-

ня п'яти тичинок у стаміноїди пелюсткового типу, із маточкою, що нечасточкова або незубчаста. 6-пелюсткові квітки мають траплятися тільки зрідка (*Tilia americana* L., *Tilia tomentosa* Moench). Визначення проводять із 30 г сировини.

**Втрата в масі при висушуванні (2.2.32).** Не більше 12.0 %. 1.000 г здрібненої на порошок сировини (355) сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 2 год.

**Загальна зола (2.4.16).** Не більше 8.0 %.

#### ЗБЕРІГАННЯ

У захищеному від світла місці.

## Фітохімічні дослідження

УДК 615.32:579:615.012

Литвиненко В.І., Попова Н.В., Павлова І.О.

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів»  
Національний фармацевтичний університет

### Дослідження бергеніну в рослинах роду бадан

У статті наведений огляд літератури щодо рослин роду бадан, їх хімічного складу, специфічної речовини — бергенін та методах встановлення його структури. Методами препаративної, паперової хроматографії та ВЕРХ із листя бадану товстолистого виділений бергенін і проведено кількісний аналіз його вмісту у 8 видах рослин цього роду. Встановлено, що найбільше бергеніну міститься в листі бадану Горбунова, найменше — в листі бадану Делава.

Рід бадан, *Bergenia Moench*, родина ломикаменеві (*Saxifragaceae*), налічує близько 11 видів, однак представники роду недостатньо вивчені. Вперше цей рід був описаний у 1794 році. Назва *Bergenia* була дана на честь німецького професора анатомії, патології та ботаніки Kagon Bergen [1].

До роду *Bergenia* (за Енглером і Прантлем) відносяться такі види [2]:

1. *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. — бадан товстолистий;

2. *Bergenia cordifolia* (Haw.) Sternb. — бадан сердцелистий;

3. *Bergenia purpurascens* (Hook. a. Thoms.) Engl. — бадан пурпурний;

4. *Bergenia delavayi* (Franch) Engl. — бадан Делава;

5. *Bergenia ligulata* (Wall.) Engl. — бадан язичковий;

6. *Bergenia stracheyi* (Hook. a. Thoms.) Engl. — бадан Стречі;

7. *Bergenia ciliata* (Royle) A. Br. — бадан війчастий.

Пізніше цей перелік був доповнений ще чотирма видами:

8. *Bergenia pacifica* Kom. — бадан тихоокеанський, виділений В.Л. Комаровим в 1911 році;

9. *Bergenia coreana* Nakai — бадан корейський, описаний в 1914 році;

10. *Bergenia gorbunovii* V. Fedtsch. — бадан Горбунова, описаний Б.А. Федченко в 1936 році;

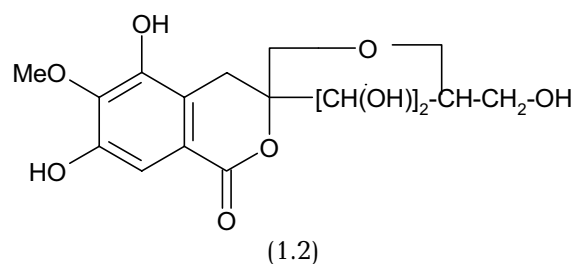
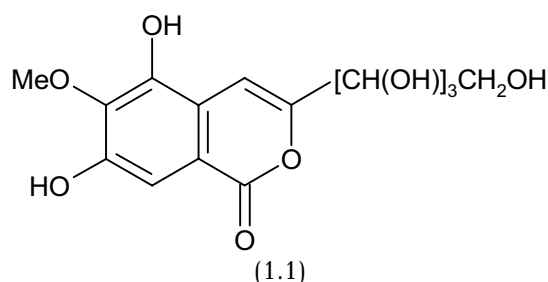
11. *Bergenia hissarica* Boriss. - бадан гісарський, описаний Ф.Г. Борисовою в 1954 році. Вид, відомий під назвою *B. himalaica* Boriss. — бадан гімалайський — є синонімом *Bergenia hissarica* Boriss.sp. nova. [2].

Найбільш вивченим видом є бадан товстолистий (*Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. [1, 2, 3], дубильні речовини коренів і кореневищ якого широко досліджені. Добре вивчений склад

та накопичення цих сполук за фазами вегетації, але специфічною речовиною для роду *Bergenia* є фенольна сполука бергенін, яка привернула нашу увагу.

Потенційні можливості використання листя бадану ще не вивчені, тому метою цієї роботи були дослідження з виділення та визначення вмісту бергеніну в різних видах рослин роду бадан.

Уперше будову бергеніну описав Чичибабін А.Е. та співроб. у 1928 році (1.1), корективи вніс Shimokogiyama в 1950 році (1.2) [4, 5, 6].



Формула 1.1 не пояснює здатність бергеніну до повного ацетилювання, вона була переглянута Shimokogiyama, який запропонував пентагідроксильну структуру (1.2). Доказом правильності формули 1.2 є те, що бергенін легко відновлює реактив Фелінга. Shimokogiyama показав, що відновна здатність бергеніну еквівалентна відновній здатності глюкози, що пояснюється утворенням кетогексозного бокового ланцюга в бергеніні при відкритті лактонного кільця.

Грунтуючися на цьому, можна чекати, що ди-О-метилбергенін міг би мати досить високу відновну здатність. Але це не так, тому що відновна здатність бергеніну має бути обумовлена наявністю двох вільних фенольних груп, а не гідроксилами бокового ланцюга. Більш того, ди-О-метилбергенін із відкритим кільцем не утворює похідних із фенілгідазином. Через те, що ди-О-метилбергенін не виявляє відновних властивостей, формула 1.1, як і формула 1.2, може вважатися вірогідною, структура 1 також має утворювати кетогексозу у відкритому лактонному кільці. Тому бергенін (синоніми: бергеніт, вакерин, ардисикова кислота, кускутин, пелтофорин) є 2-β-D-глюкопіранозидом 4-О-метилгалової кислоти. Молекулярна формула  $C_{14}H_{19}O_9 \cdot H_2O$ , запропонована Чичибабіним А.Е. [1, 5], підтверджена сучасними роботами та результатами ЯМР-, ІЧ- та рентгенівського аналізу. Визначено молекулярну масу бергеніну, що становить  $344 \pm 4$  [6, 7, 8, 9, 9a].

Бергенін знайдений в рослинах роду *Bergenia* (*Bergenia crassifolia*), роду *Astilba* (*A. thundersia*, *A. chinensis*, *A. Rinularis*), у *Rhodoila kirilowii*, у траві *Ardisia Japonica*, *Mallolotus japonicus*, у корі *Corylopsis spicata*, *Connarus semidecandrus*, у деревині *Shorea eprosula*, у коренях рослин роду *Caesalpinia* (*C. dizina*, *C. digyna*), у корі *Hopea utilis*. Похідні бергеніну - 11-О-сирингілбергенін і норбергенін знайдено в коренях рослин роду *Ardisia* (*A. orenata*, *A. japonica*) [7-21].

Сучасні фармакологічні дослідження показали, що бергенін виявляє противиразкову активність [20]. Метанольний екстракт зі стебел *Connarus semidecandrus* і виділений із нього бергенін має жарознижувальну дію [17]. Таблетки бергеніну у китайській медицині застосовуються як протикашльовий засіб і рекомендуються при хронічному бронхіті [19]. Індійські вчені повідомляють, що бергенін із бруньок *Peltophorum pterocarpum* має протизапальну дію [21].

#### Матеріали та методи

Об'єктом дослідження було листя *Bergenia pacifica*, *Bergenia stracheyi*, *Bergenia crassifolia*, *Bergenia delavayi*, *Bergenia gorbunovii*, *Bergenia himalaica*, *Bergenia cordifolia*, зібрані у м. Харкові: у ботанічному саду ХНУ, на фармакопейних ділянках НФаУ та ДП ДНЦЛЗ. Екстрактивні речовини досліджували у витягах, що були одержані двома способами — вакуум-фільтраційним та за фармакопейною методикою.

Для хроматографічного аналізу використовували папір різних сортів Filtrak FN-1, FN-4, FN-14, ТШХ пластинки із шаром силікагелю («Silufol», Чехія).

Для розділення складних сумішей сполук застосовували одно- і двовимірну хроматографію за одно- і дво- та багаторазового проходження розчинників [22 - 25].

Хроматографічний розподіл бергеніну проводили у системах: 15 % розчин кислоти оцтової, етилацетат — кислота мурашина — вода (10:2:3), етилацетат — кислота оцтова — вода (3:1:3) (хроматографія на папері); бутанол — кислота оцтова — вода (4:1:2) (хроматографія на папері та тонкошарова хроматографія); хлороформ — метанол (8:2) (тонкошарова хроматографія) [22-25].

Для виділення бергеніну з метою очищення від ліпофільних речовин сировину попередньо обробляли петролейним ефіром. Далі сировину екстрагували 70 % спиртом. Одержаний спиртовий екстракт концентрували при нагріванні під вакуумом до густого водного залишку. Одержаний водний концентрат фракціонували в розчинниках (за розчинністю): діетиловий ефір, етилацетат, н-бутанол до і після підкислення. Кожну фракцію аналізували за допомогою хроматографії на папері. Хроматографічний розподіл фенольних сполук проводили в системі бутанол — кислота оцтова — вода (БУВ) (4:1:2, 4:1:5), а також в 2 %, 5 %, 15 % розчинах кислоти оцтової в одновимірному та двовимірному напрямку. Для виділення бергеніну з рослинної сировини використовували колонкову хроматографію на поліаміді та препаративну хроматографію на папері. Структуру бергеніну встановлювали за допомогою фізичних і хімічних методів аналізу. Температуру плавлення сполук визначали на блоці Кофлера.

ВЕРХ-аналіз дозволив визначити кількісний вміст бергеніну. Ідентифікацію проводили за часом утримування сполуки [26].

При підготовці проби до аналізу сухі екстракти, а також чисті сполуки розчиняли у суміші рухомих фаз А і В у співвідношенні 1:1. Одержаний розчин фільтрували та вводили пробу — 1 мкл. Аналіз проводили на рідинних хроматографах Міліхром А-02 (Росія) із двопробним УФ-детектором і Міліхром-01 (Росія).

Хроматографування на приладі Міліхром А-02 проводили за таких умов: колонка розміром: (75 × 2) мм; нерухома фаза: Nucleosil 100-5 С-18; рухома фаза А: фосфатний буферний розчин рН 2.8; рухома фаза В: ацетоніт-

рил; градієнт: 0-10 хв - від 3 % до 40 % (В), 10-13 хв — від 40 % до 100 % (В), 13-15 хв — 100 % (В); швидкість рухомої фази 200 мкл/хв; детектування за довжин хвиль 250 нм; 270 нм; 290 нм; 320 нм; 360 нм; температура колонки 35 °С.

Хроматографування на приладі Мілі-хром-01 проводили за таких умов: колонка розміром (82 × 2) мм; нерухома фаза: Nucleosil 100-5 С-18 із розміром часток 5 мкм; рухома фаза А: фосфатний буферний розчин рН 2.5; рухома фаза В: ацетонітрил - метанол (1:1); швидкість рухомої фази 200 мкл/хв; детектування за довжини хвилі 280 нм; температура колонки: 35 °С.

Кількісне визначення досліджуваної сполуки проводили методом зовнішнього стандарту за градувальними розчинами. Ідентифікацію речовин на хроматограмах проводили за часом утримування індивідуальних речовин, що були одержані раніше із листя, коренів та кореневищ бадану товстолистого (Рис. 1) [26].

#### Результати та їх обговорення

Із листя бадану хроматографією на поліамідному сорбенті з етилацетатної фракції виділено речовину, що являє собою кристалічний порошок білого кольору.

Сполука, кристалізована з метанолу, мала температуру плавлення 238 °С. Показник заломлення  $[\alpha]_D^{18} = 37.7$  ( $C = 1.96 \%$ ) в етанолі та  $[\alpha]_D^{24} = 45.3$  ( $C = 0.51 \%$ ) для ангідриду у воді. Ця сполука розчинна у воді й легко розчинна у спирті. Моногідрид, що кристалізується з води, має температуру плавлення 140 °С. Дані УФ-спектрального аналізу показали, що максимуми поглинання спостерігаються за довжин хвиль 275 нм і 220 нм, що співпадає з літературними даними [5].

За хроматографічною рухливістю, флуоресценцією в УФ-світлі було встановлено, що речовина на хроматограмах не мала специфічної флуоресценції, вона виявлялася за реакцією азосполучення (рожево-червоне забарвлення) або за реакцією із заліза (III) хлоридом. Хроматографічні характеристики сполуки, виділеної з листя бадану, наведено у Табл. 1.

Таблиця 1

#### Хроматографічні характеристики бергеніну

Забарвлення сполуки		$R_f$ у системах розчинників			
в УФ-світлі	+ пари аміаку	15 % розчин кислоти оцтової	БОВ (4:1:2)	етилацетат – кислота оцтова - вода (3:1:3)	метанол – хлороформ (8:2)
-	-	0.43	0.58	0.5	0.45

На підставі одержаних результатів та при порівнянні з достовірним зразком встановили, що за хімічною структурою це — 2-С-глюкопіранозил-4-О-метоксигалової кислоти або бергенін.

Таким чином, за фізико-хімічними властивостями і при порівнянні з достовірним зразком сполуку ідентифікували як бергенін або 2-С-глюкопіранозил — 4-О-метоксигалової кислоти.

Для ВЕРХ-аналізу (Рис. 1а, 1б) екстракти із листя бадану готували вакуум-фільтраційним методом. Для одержання екстракту із листя бадану товстолистого брали точну наважку сировини й екстрагували 70 % спиртом у співвідношенні 1:10.

На хроматограмах екстракту (Рис. 1а) присутній пік, що за часом утримування відповідає бергеніну. Вміст бергеніну в екстрактах із листя рослин роду бадан наведено в Табл. 2.

#### Висновки

Методами препаративної та колонкової хроматографії на поліаміді з листя бадану виділено С-глікозид — бергенін (С-глюкопіранозил — 4-О-метоксигалової кислоти). Був проведений кількісний аналіз бергеніну методом ВЕРХ в екстрактах із листя рослин різних видів роду бадан.

Встановлено, що найбільше бергеніну міститься в листі бадану Горбунова, а менше всього — у листі бадану Делава.

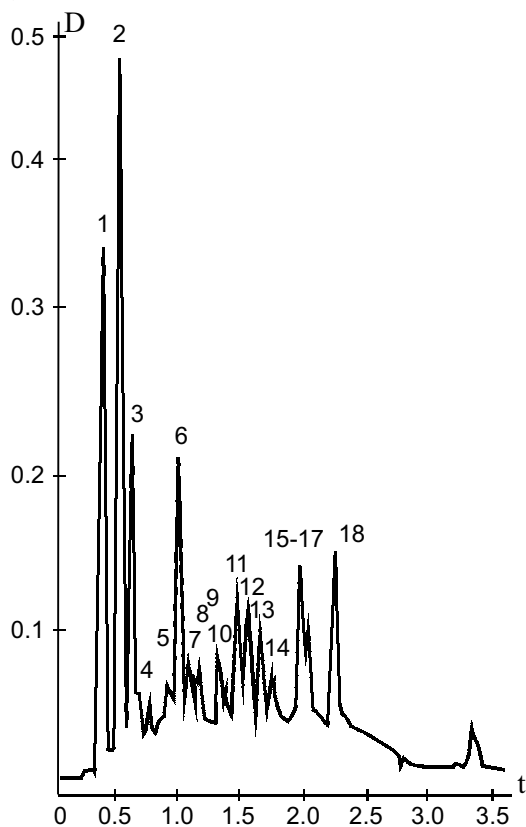
Для даного виду сировини бергенін є специфічною сполукою, тому результати якісного та кількісного його визначення можуть бути використані для розробки аналітичної нормативної документації на сировину «Листя бадану товстолистого».

#### ЛІТЕРАТУРА

- Борисова А.Г. Бадан, его систематика и хозяйственное значение // Растительные ресурсы. - 1966. - Т. 5. - Вып. 4. - С. 297-339.
- Епова Н.А. К истории ареала бадана толстолистого *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. // Известия биолого-географического научно-исследовательского ин-та при Иркутском ун-те. Серия биологическая. - Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1955. - 110 с.
- Попова Н.В., Литвиненко В.И., Кожух И.А. Качественный и количественный анализ листьев бадана толстолистого // Достижения современной фармації та перспективи її розвитку у новому тисячолітті: Матеріали V на-



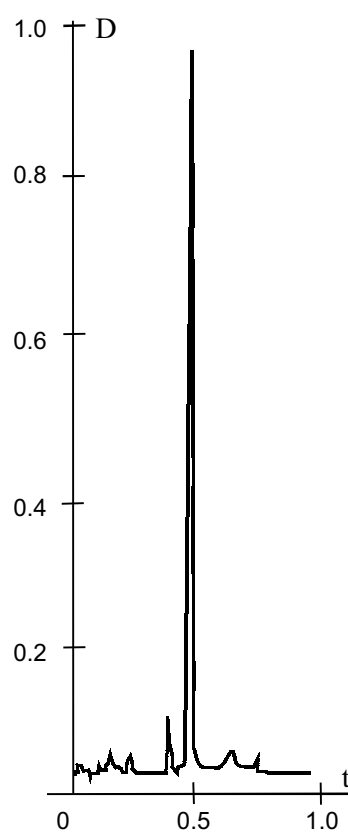
Рисунок 1а



ВЕРХ-аналіз екстракту бадану  
(2 – бергенін)

t — час утримування, хв; D — оптична густина.

Рисунок 1б



ВЕРХ-аналіз бергеніну

Таблиця 2

Кількісний вміст бергеніну в екстрактах із листя рослин різних видів роду бадан

Вид бадану	Вміст бергеніну, %
<i>Bergenia ciliata</i>	5.96
<i>Bergenia pacifica</i>	8.52
<i>Bergenia stracheyi</i>	6.09
<i>Bergenia crassifolia</i>	6.14
<i>Bergenia delavayi</i>	1.44
<i>Bergenia gorbunovii</i>	18.48
<i>Bergenia himalaica</i>	11.25
<i>Bergenia cordifolia</i>	12.44

ціонального з'їзду фармацевтів України. — Харків, 1999. — С. 321-322.

4. Evelin J.H., Haynes L.J. Bergenin and C-Glycopyranosyl Derivative of 4-O-Methylgallyc Acid // F. Chem. Soc. - 1958. — P. 2231-2238.

5. Tschitschibabin A.E., Kirsanov A.W., Korolev A.J Woroschizow jun N.N. Uber nichtgerbende Substanzen des Extractes aus dem Wurzelstock des Badan (*Saxifraga crassifolia*). 1. Bergenin // Justus Liebigs Annalen der Chemie. - 1929. - Bd. 469. - S. 93-127.

6. Амосова Е.Н., Зуева Е.П., Гольдберг Е.Д. Растения Сибири и Дальнего Востока — источники поисков лекарственных препаратов для онкологической практики // Фармакология и токсикология. - 1991. - № 6. - С. 3-7.

7. The Merck index. - 20 ed. - Merck and Co. Inc., 1998. - P. 194.

8. Janodar L., Kolb I., Lycka A. NMR spectral analysis of bergenin // Fitoterapia. — 1992. - Vol. 63, No. 3. - P. 260-261.

9. Литвиненко В.И., Попова Т.П., Аммосов А.С. Гликофлавоноиды // Технология и стандартизация лекарств: Сб. науч. тр. — Т. 2. - Харьков: «РИРЕГ». — 2000. - С. 81 — 199.

9a. Han L.K, Ninomiya H., Taniguchi M., Baba K., Kimura Y., Okuda H. Norepinephrine - augmenting lipolytic effecters from *Astilbe thunbergii* rhizomes // J. Nat. Prod. - 1998. - Vol. 61, No. 8. - P. 1006-1011.

10. Kim H.S., Lim H.K., Chung M.W., Kim Y.C. Related Articles. Antihepatotoxic activity of bergenin. The major

- constituent of *Mallolotus japonicus*, on carbon tetrochlorid - intoxicated hepatocytes // J. Ethnopharmacol. - 2000. - Vol. 69, No. 1. - P. 79-83.
11. Piacente S., Pizza C., De Tomvsi, Mahmood N. Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti - HIV activity // J. Nat. Prod. - 1996. - No. 59. - P. 565.
12. Xinguang Z, Zhong C., Jianliang Y. // J. Xiamen Univer. Natur. Sc. - 1999. - Vol. 38, No. 6 - P. 950-977.
13. Antifeedant activity of bergenin isolated from *Astilba rinularis* / M. Tandon, Y.N. Shuklo, A.R. Tripathi, S. Sharma // Fitoterapia. - 1996. - No. 3. - P. 10.
14. Rousseau C., Martin O. R. Synthesis of bergenin - related natural products by way of an intermolecular C-glycosylation reaction // Tetrahedron: Asymmetry. - 2000. - No. 11. - P. 409-412.
15. Frick W., Hofmann J., Fischer H. The structure of bergenin // Carbohydr. Res. - 1991. - Vol. 20, No. 3. - P. 7.
16. Н.В. Попова, І.О. Кожух, А.В. Мартинов. Перспективи використання рослин роду бадан // Вчені України - вітчизняній фармації: Матеріали наук.-практ. конф. - Харків, 2000. - С.157-158.
17. Antipyretic activity of *Connarus semidecandrus* extract in rats / Wantana Reanmogkol, Sanan Suhadhirasakul, etc // J. Sci. Technol. - 2000. - No. 22(2). - P.191-198.
18. Lim H.K., Kim H.S., Chung M.W., Kim Y.C. Protective effects of bergenin, the major constituency of *Mallolotus japonicus*, on D-galactosamine - intoxicated rat hepatocytes // J. Ethnopharmacol. - 2000. - No. 70. - P. 69-72.
19. Zhang S., Wang J., Zhang H. Chemical constituents of Tibetan medicinal herb *Rhodiola kirilowii* (Reg.) Reg. // Chung Kuo Chung Yao Tsa Chin. - 1991. - Vol. 16, No. 8. - P. 512.
20. Goel R.K., Maiti R.N., Manicckam M. Antiulcer activity of naturally occurring pyrano - coumarin and isocoumarins and their effect on prostanoid synthesis using human colonic mucosa // Indian J. Exp. Biol. - 1997. - Vol. 35, No. 10. - P. 1080.
21. Chopin A.S., Handa S.S, Sharma A.K., Kaith B.S. Plant and anti - inflammatory agent // J. Sci. and Ind. Res. - 1987. - Vol. 46, No. 5. - P. 214 - 223.
22. Хроматография на бумаге / Под ред. И.М. Хайса и К. Мацека. - М.: Иностр. лит-ра, 1962. - 851 с.
23. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии: В 2-х ч. - М.: Мир, 1980. - 622 с.
24. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. - М.: Мир, 1965. - 507 с.
25. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. - Новосибирск: «Наука», 1990. - 336 с.
26. Кожух І.О. Фармакогностичне дослідження рослин роду бадан: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук. - Харків, 2002. - 19 с.

#### Резюме

Литвиненко В.И., Попова Н.В., Павлова И.А.

#### Исследование бергенина в растениях рода бадан

В статье приведен обзор литературы о растениях рода бадан, их химическом составе, специфическом веществе - бергенине и методах установления его структуры. Методами препаративной, бумажной хроматографии и ВЭЖХ из листьев бадана толстолистного выделен бергенин и проведен количественный анализ его содержания в 8 видах растений этого рода. Установлено, что больше всего бергенина содержится в листьях бадана Горбунова, меньше всего - в листьях бадана Делава.

#### Summary

Litvinenko V.I., Popova N.V., Pavlova I.A.

#### Investigation of bergenin in *Bergenia* genus plants

In the article the literature review of *Bergenia* genus plants, their chemical composition, specific substance - bergenin and methods of its structure determination is presented. By methods of preparative, paper chromatography and HPLC from leaves of *Bergenia crassifolia* bergenin was isolated and quantitative analysis of bergenin content in 8 species of this genus was conducted. It was established that the highest content of bergenin is in *Bergenia gorbunovii* leaves, and the lowest - in *Bergenia delavayi* leaves.

**Литвиненко Василь Іванович** (н. 1932). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1959). Д.х.н. (1990). Професор (1991). Академік ІА України (2000). Зав. сектором хімії та технології фенольних сполук ДП ДНЦЛЗ.

**Попова Наталія Вячеславівна**. Закінчила Харківський фармацевтичний інститут (1981). К.фарм.н. (1986). Доцент кафедри фармакогнозії НФаУ (1991).

**Павлова Ірина Олександрівна**. Закінчила Національний фармацевтичний університет (1997). К.фарм.н. (2003). Асистент кафедри фармакогнозії НФаУ (2002).

УДК 615.07:[547.972:582.929.4]

Бовтенко В.А., Рыбаченко А.И., Литвиненко В.И., Попова Т.П., Бобкова Л.Н.  
Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

## Стандартизация флавоноидного состава водно-спиртовых экстрактов листьев мяты перечной

Предложен метод стандартизации листьев *Mentha piperita* L. по количественному составу флавоноидной части действующих веществ методом дифференциальной спектрофотометрии. В качестве вещества-стандарта предложен гесперидин — один из основных флаваноновых гликозидов мяты перечной.

Мята перечная (*Mentha piperita* L.) — культивируемое травянистое растение. В дикорастущем виде не встречается. Является гибридом двух дикорастущих видов: мяты водяной (*Mentha aquatica* L.) и мяты колосковой (зеленой) *Mentha spicata* Gilib. (*Mentha viridis* L.). Промышленно выращивается для получения эфирного масла и ментола. Так, высокоментольные промышленные сорта мяты перечной «Прилуцкая 6», «Краснодарская 2» и др. содержат до 5 % эфирного масла, в котором до 70 % ментола [1]. Учитывая эти направления промышленного использования мяты перечной, сформировался подход к стандартизации как самого растительного сырья, так и лекарственных препаратов на его основе по содержанию эфирного масла и ментола. Государственной Фармакопеей СССР XI издания (ГФ XI) выставлены требования к растительному сырью по содержанию эфирного масла — не менее 1 % [2]. В Европейской Фармакопее, помимо нормирования количественного содержания эфирного масла, описана идентификация компонентов эфирного масла (ментол, цинеол, тимол, ментилацетат, ментон) методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [3]. Однако спектр биологически активных веществ, содержащихся в траве мяты перечной, не ограничивается компонентами эфирного масла. Сырье богато также и фенольными соединениями.

В литературных источниках упоминаются две основные группы фенольных соединений, характеризующих биологическую активность препаратов травы мяты перечной: гидроксикоричные кислоты (кофейная, розмариновая, хлорогеновая [6]) и флавоноидные соединения (описано около 40 веществ различной структуры [7-12]).

В начале 70-х годов XX столетия в ГНЦЛС был получен полифенольный комплекс мяты перечной и показана его высокая фармакологическая активность как противопастышечного, противовоспалительного и противотечного средства [4]. В то же время на ка-

федре фармакогнозии Харьковского фармацевтического института были выделены некоторые индивидуальные флавоноиды мяты перечной, такие как изороифолин (триоксифлаво-7-(β-D-глюкопиранозил-6-α-L-рамнопиранозид) и ментозид (4'-транскофеил, 5,7,4'-триоксифлаво-7-(β-D-глюкопиранозил-6-α-L-рамнопиранозид), и изучена их структура [5]. К сожалению, указанные работы не получили дальнейшего развития.

Несмотря на то, что фенольные соединения, содержащиеся в траве мяты перечной, обладают рядом фармакологических свойств, до настоящего времени отсутствуют данные по систематическому изучению их качественного и количественного состава в отечественных промышленных сортах данного сырья, не проведена его стандартизация по содержанию суммы флавоноидов и на уровне индивидуальных соединений. Решению этих задач посвящена настоящая работа.

### Объекты и методы

Исследования проводили на экстрактах, полученных из листьев мяты перечной промышленного сорта «Прилуцкая 6» путем последовательной проточной экстракции из мелкоизмельченного сырья сначала горячим 96 % спиртом (экстракт А), а затем горячим 70 % спиртом (экстракт Б). Количество экстрактивных веществ, извлекаемых при указанном способе экстракции, составляет в среднем 6.8 % для экстракта А и 7.5 % для экстракта Б.

В качестве достоверных образцов были использованы гесперидин, полученный из плодов цитрусовых и гесперидин, полученный из травы мяты перечной, лютеолин 7-глюкозид, кофейная и хлорогеновая кислоты. Достоверные образцы гесперетина и лютеолина были получены путем кислотного гидролиза соответственно гесперидина и лютеолина 7-глюкозида. Все указанные вещества выделены и очищены в секторе ХТФП ГП ГНЦЛС. Идентичность всех образцов под-

тверждена соответствием ИК-спектров и температуры плавления. Содержание примесей, установленное методом ТСХ, не превышало 5%. Образцы гесперидина, используемые при определении удельного показателя поглощения, дополнительно очищались перекристаллизацией из 96% спирта до содержания примесей менее 1.5%.

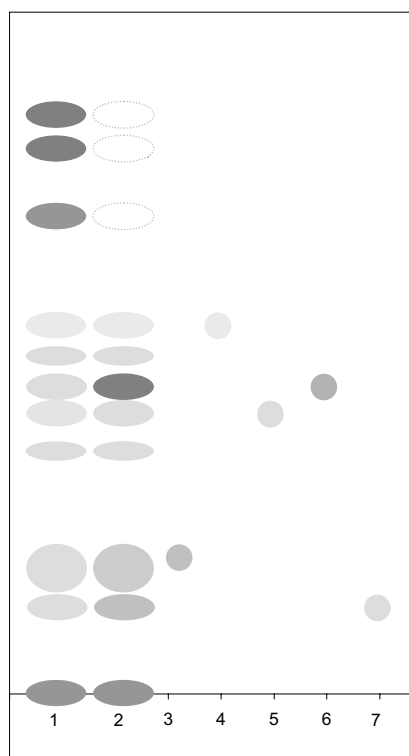
Идентификацию основных фенольных компонентов экстрактов проводили методами ТСХ и ВЭЖХ.

При идентификации методом ТСХ разделение проводили на стандартных пластинах «Силуфол УФ-254» и «Kieselgur F<sub>254</sub>». В качестве подвижной фазы использована система растворителей бензол – метанол – метилэтилкетон – ацетилацетон (40:16:3:1) [16].

Идентификацию компонентов методом ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе с УФ-детектором. Разделение проводили на колонке размером (3.9 × 150) мм, заполненной сорбентом Symmetry C18 с размером частиц 5 мкм.

Для разделения фенольных соединений на колонках с обращенной фазой известны различные хроматографические системы [6, 13,

Рисунок 1



Хроматограмма экстрактов А и Б

1 — экстракт А; 2 — экстракт Б; 3 — гесперидин; 4 — гесперетин; 5 — лютеолин 7-глюкозид; 6 — кислота кофейная; 7 — кислота хлорогеновая.

14]. Мы получили удовлетворительные результаты в следующих условиях: подвижная фаза ацетонитрил — 0.1% раствор кислоты ортофосфорной в воде (1:5), температура колонки 30 °С, скорость подвижной фазы 1 мл/мин, длина волны детектирования 280 нм.

Количественное содержание суммы флавоноидов определяли методом дифференциальной спектрофотометрии [15]. Раствор достоверного образца гесперидина готовили в смеси диметилсульфоксида — 96% спирт (1:9).

### Результаты и их обсуждение

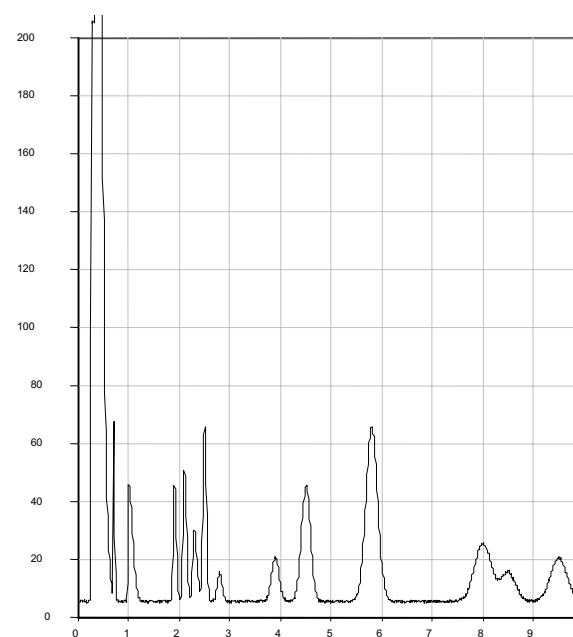
#### Тонкослойная хроматография

В исследуемых экстрактах идентифицированы флавановый гликозид гесперидин (7-рутинозид 5,7,4'-тригидрокси 3'-метоксифлаванон) ( $R_f$  около 0.22), гесперетин (5,7,4'-тригидрокси 3'-метоксифлаванон) ( $R_f$  около 0.54), лютеолин (5,7,3'4'-тетрагидроксифлаванон) ( $R_f$  около 0.40), кофейная кислота ( $R_f$  около 0.45), хлорогеновая кислота ( $R_f$  около 0.16).

#### Высокоэффективная жидкостная хроматография

Идентифицировано и установлено количественное содержание в сухом лекарственном сырье флаванового гликозида гесперидина и флавонового гликозида лютеолин-7-глюкозида в экстрактах А и Б (Рис. 1, 2) (Табл. 1).

Рисунок 2



Хроматограмма экстракта А

1 — лютеолин 7-глюкозид; 2 — гесперидин.

Таблица 1

Содержание флавоноидов в исследуемых образцах, определенное методом ВЭЖХ

Вещество	Содержание (экстракт А), %	Содержание (экстракт Б), %
лютеолин 7-глюкозид	0.007	0.008
гесперидин	0.08	0.07
сумма флавоноидов	0.115	0.115

Из полученных данных видно, что содержание гесперидина превышает содержание лютеолин 7-глюкозида в обоих извлечениях. Суммарное содержание флавоноидов в сухом лекарственном сырье, в пересчете на гесперидин, проведенное методом суммирования площадей пиков, составляет около 1.0 % для экстракта А и 1.8 % для экстракта Б, что согласуется с данными спектрофотометрии.

*УФ-спектрофотометрия*

Определение количественного содержания суммы флавоноидов данным методом основано на реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом. Оптимальное время проведения реакции — 60 мин при комнатной температуре или 15 мин при нагревании растворов образцов препарата и вещества-стандарта на водяной бане при температуре 70 °С.

На полученных дифференциальных спектрах поглощения алюминиевого комплекса хорошо выделен пик при длине волны 306 нм, характерный, в частности, для гесперидина [15]. Дополнительно присутствуют полосы

поглощения при в области длин волн 360-400 нм и в области длин волн 440-450 нм, характерные для других классов флавоноидов (Рис. 3). Полоса поглощения в области длин волн 360-400 нм указывает на наличие флавоновых соединений (в основном производных лютеолина, апигенина), а полоса в области длин волн 440-450 нм характерна для халконов и ауранов. Последние полосы достаточно диффузны и позволяют говорить только о суммарных спектрах поглощения.

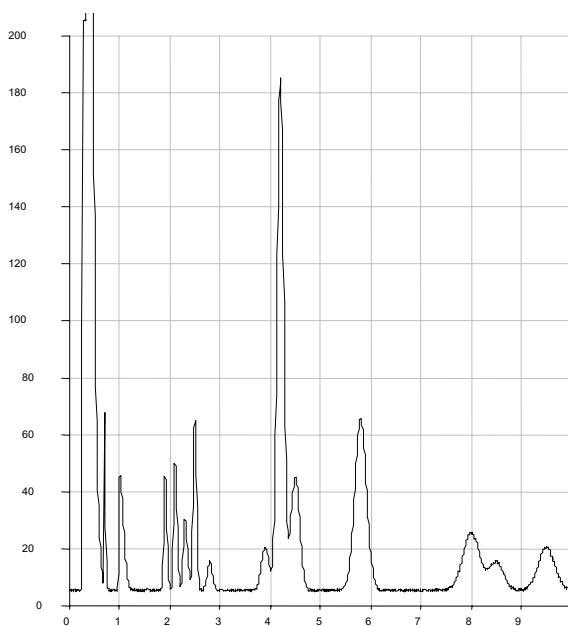
Рассчитан удельный показатель поглощения комплекса гесперидина с алюминия хлоридом при длине волны 306 нм, равный  $201 \pm 5$ . В области рабочих концентраций (30-100 мкг/мл) поглощение комплекса гесперидина с алюминия хлоридом подчиняется основному закону светопоглощения Бера.

Содержание суммы флавоноидов в листьях мяты перечной, в пересчете на гесперидин, в исследуемых образцах составляет в среднем около 0.9 % для экстракта А и 1.6 % для экстракта Б (Табл. 2).

*Выводы*

Методом ТСХ оценен качественный состав водно-спиртовых экстрактов листьев мяты перечной сорта «Прилуцкая 6». Идентифицированы флавоноиды гесперидин, гесперетин и лютеолин, а также гидроксикоричные кислоты — кофейная и хлорогеновая.

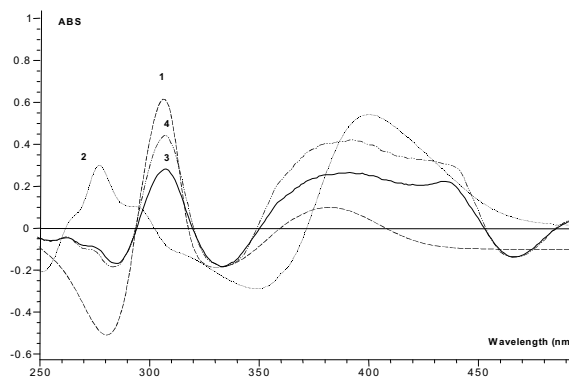
Рисунок 3



Хроматограмма экстракта Б

1 — лютеолин 7-глюкозид; 2 — гесперидин.

Рисунок 4



Дифференциальные спектры поглощения комплексов с алюминия хлоридом

1 — гесперидин; 2 — лютеолин 7-глюкозид; 3 — экстракт А; 4 — экстракт Б.

Таблица 2

Содержание суммы флавоноидов в лекарственном растительном сырье, определенное спектрофотометрическим методом

Номер серии лекарственного растительного сырья	Содержание суммы флавоноидов (экстракт А), %	Содержание суммы флавоноидов (экстракт Б), %
10.11.99	0.8	1.4
11.11.99	0.9	1.6
01.03.03	1.2	1.8
02.03.03	1.0	1.6
03.03.03	0.5	1.0

Проведена оценка качественного и количественного состава флавоноидов мяты перечной методом ВЭЖХ. Содержание суммы флавоноидов в сухом сырье, в пересчете на гесперидин, составляет около 1.0 % для экстракта А и 1.8 % для экстракта Б, что составляет около 14.7 % и 24.0 %, в пересчете на общее количество экстрактивных веществ, соответственно.

Методом дифференциальной спектрофотометрии проведено определение количественного содержания суммы флавоноидов. Для флавоноидов мяты перечной установлено преимущественное содержание флаванового гликозида — гесперидина, рассчитан его удельный показатель поглощения. Количество флавоноидов в листьях мяты перечной, в пересчете на гесперидин составляет 0.9 % для экстракта А и 1.7 % для экстракта Б или 13.2 % и 22.7 %, в пересчете на общее количество экстрагируемых веществ, соответственно.

Использование метода дифференциальной спектрофотометрии при определении количественного содержания суммы флавоноидов является более предпочтительным по сравнению с методом ВЭЖХ. Это связано, прежде всего, с наличием в экстрактах значительного количества липофильных веществ, в частности терпеноидов, которые в условиях проведения анализа сорбируются на колонке, некоторые необратимо, и меняют свойства сорбента. При этом после хроматографирования пробы необходимо регенерировать колонку, что увеличивает время проведения анализа, требует дополнительного расхода растворителей и затрудняет проведение серийных испытаний. Использование предколонки лишь частично решает проблему. После проведения серии из 10 испытаний изменяется проницаемость предколонки и требуется ее восстановление.

Учитывая вышеизложенное, рекомендуем при стандартизации препаратов мяты перечной по содержанию флавоноидов использо-

вать метод дифференциальной спектрофотометрии как более экономичный и непродолжительный по времени.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Муравьева Д.А. Фармакогнозия. - М.: Медицина, 1978. — С. 206-209.
2. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. - 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — С. 261-262.
3. European Pharmacopoeia. - 3<sup>rd</sup> ed. — Strasbourg: Council of Europe, 1996. — P. 1298.
4. Мусін М.Н., Хаджай Я.І., Литвиненко В.І., Аммосов О.С. Протизапальна активність поліфенольного препарату одержаного з м'яги перцевої // Фармац. журнал. - 1976. — № 2. — С. 76-78.
5. Гелла Е.В., Макарова Г.В., Борисюк Ю.Г., Литвиненко В.І. Флавоноїди м'яги перцевої. Повідомлення 2 // Там же. - 1966. — № 3. — С. 58-66.
6. Гелла Е.В., Макарова Г.В., Борисюк Ю.Г., Флавоноїди м'яги перцевої. Повідомлення 1 // Там же. - 1965. — № 4. — С. 31-33.
7. Захарова О.И., Захаров А.М., Глызин В.И., Смирнова Л.П. Флавоны *Mentha piperita* сорта Кубанская 6 // Химия природных соединений. - 1982. — № 5. — С. 652.
8. Захарова О.И., Захаров А.М., Смирнова Л.П., Ковинева В.М. Флавоны *Mentha piperita* сортов Прилуцкая 6 и Кубанская 6 // Там же. - 1983. — № 5. — С. 645-646.
9. Захарова О.И., Захаров А.М., Смирнова Л.П. Флавоны *Mentha piperita* сорта Краснодарская 2 // Там же. - 1987. — № 1. — С. 143-144.
10. Захарова О.И., Захаров А.М., Смирнова Л.П. Флавоны *Mentha piperita* сорта Краснодарская 2 // Там же. - 1990. — № 1. — С. 118-119.
11. Burzanska-Hermann Z. Izolacja i idetifikacja skladnikow frakcji flawonoidowej z ziela krajowych gatunkow rodzaju *Mentha* L. sekcja *Verticillatae* (*M. arvensis* L., *M. sachalinensis* Kudo, *M. x verticillata* L., *M. x smithiana* Graham, *M. x gentilis* L.) // Acta Polon. Pharm. — 1978. — Vol. 35, No 6. — P. 673-680.
12. Voirin, B., Bayet C., et al. Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* and *M. x piperita* // Phytochemistry. - 1999. — Vol. 50. — P. 1189-1193.
13. Хроматография. Практическое приложение метода / Под ред. Э. Хефтман: Пер. с нем. - М.: «Мир», 1986. — С. 268-273.
14. Okamura N., Maki T., Ishida S., et al. Dissolution profiles of principal ingredients in Kampo medicinal powders by HPLC // Chem. Pharm. Bull. - 2000. — Vol. 48. — P. 1782-1785.
15. Marby T.J., Markham K.R., Thomas M.B. The systematic identification of flavonoids. — Berlin — Heidelberg - New York: Springer-Verlag, 1970. — P. 217.

16. Георгиевский В.П., Рыбаченко А.И., Казаков А.Л. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений. — Ростов: Изд-во РГУ, 1988. — С. 144.

#### Резюме

Бовтенко В.О., Рыбаченко А.И., Литвиненко В.И., Попова Т.П., Бобкова Л.Н.

#### Стандартизація флавоноїдного складу водно-спиртових екстрактів листя м'яти перцевої

Запропоновано метод стандартизації листя *Mentha piperita* L. за кількістним складом флавоноїдної частини діючих речовин методом диференційної спектрофотометрії. Як речовину-стандарт запропоновано гесперидин — один з основних флавононових глікозидів м'яти перцевої.

#### Summary

Bovtenko V.A., Rybachenko A.I., Litvinenko V.I., Popova T.P., Bobkova L.N.

#### The standardization of flavonoidic composition of aqueous - alcoholic extracts of *Mentha piperita* L. leaves

The method of *Mentha piperita* L. leaves standardization by quantitative composition of flavonoidic part of active substances by the method of differential spectrophotometry was suggested. As a substance — standard was suggested hesperidine — one of *Mentha piperita* base flavonoidic glycosides.

УДК 615.322:582.772

Керимов Ю.Б., Исаев Д.И., Деркач А.И.

Азербайджанский медицинский университет

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

#### Получение и изучение эсцина из околоплодника *Aesculus hippocastanum* L.

Изучен околоплодник растения *Aesculus hippocastanum* L. как источник получения эсцина. Установлено, что содержание эсцина в сырье составляет от 1.5 % до 2.5 %. В качестве метода выделения эсцина из растительного сырья предложена экстракция н-бутанолом, насыщенным водой. В результате гидролиза установлено, что выделенный эсцин представлен такими агликонами как эсцигенин, баррингтогенол D, баррингтогенол C и протозэсцигенин. Сахарная часть состоит из D-глюкозы, D-галактозы, D-ксилозы и D-глюкуроновой кислоты.

Родиной каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) является Балканский полуостров. В Азербайджане каштан конский культивируется как декоративное дерево [1]. Семена каштана конского (Semen Hippocastani) являются ценным сырьем для изготовления ряда лекарственных препаратов Эскузан, Венитан, Веноплант, Эссавен и др. Эти препараты применяются как венотонирующие и антитромботические средства при застое крови в нижних конечностях, расширении вен, геморрое и язвах голени [2-4]. В семенах, околоплодниках каштана конского содержатся кумарины, сапонины, флавоноиды, липиды, меланин и др. биологически активные вещества [5-11]. Следует отметить, что ранее другими исследователями для установления содержания эсцина в каштане конском были изучены его семена. Эсцин из се-

**Бовтенко Владимир Александрович** (р. 1970). Окончил Харьковский государственный университет (1994). Мл.науч.сотр. лаборатории аналитической химии ГП ГНЦЛС.

**Рыбаченко Анатолий Иванович** (р. 1948). Окончил Харьковский государственный университет (1971). К.х.н (1982). Зав. лабораторией аналитической химии ГП ГНЦЛС.

**Литвиненко Василий Иванович** (р. 1932). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1959). Д.х.н. (1990). Профессор (1991). Академик ИА Украины (2000). Зав. сектором химии и технологии фенольных препаратов ГП ГНЦЛС.

**Попова Татьяна Павловна.** Окончила Харьковский фармацевтический институт (1970). К.фарм.н. (1988). Ст. науч. сотр. сектора химии и технологии фенольных препаратов ГП ГНЦЛС.

**Бобкова Людмила Николаевна.** Окончила Харьковский государственный университет (1968). К.фарм.н. (1991). Ст. науч. сотр. лаборатории аналитической химии ГП ГНЦЛС.

мян каштана конского получают водно-спиртовой экстракцией с последующим концентрированием, обработкой хлороформом, этилацетатом, подкислением водного остатка кислотой хлористоводородной. Выпавший в осадок эсцин отфильтровывают, промывают и сушат. Выход эсцина составляет от 1.6 % до 3 % [5, 8].

Целью нашей работы являлось выделение и изучение эсцина из околоплодника *Aesculus hippocastanum* L.

#### Экспериментальная часть

Околоплодник каштана конского, собранного в сентябре 2003 года в Гусарском районе Азербайджанской Республики, высушивали и измельчали. 1000 г сырья дважды экстрагировали пятикратным количеством н-бутанола, насыщенного водой, при нагревании

до температуры 70 °С в течение 30 мин. Извлечение концентрировали до объема 3 л и пропускали через колонку, заполненную оксидом алюминия (нейтральным) (h = 10 см, Ø = 5 см) с целью окончательного удаления флавоноидов. Очищенное бутанольное извлечение концентрировали в вакууме до удаления бутанола, остаток растворяли в 800 мл воды очищенной. После подкисления водного раствора кислотой хлористоводородной концентрированной до pH 1.6-2 раствор нагревали до прозрачного состояния и оставляли на кристаллизацию при комнатной температуре. Через 1 сут выпавшие белые кристаллы отфильтровывали и промывали водой очищенной до нейтральной реакции. Полученные кристаллы высушивали. Выход эсцина составил 2.2 %.

Полученный эсцин хроматографировали на бумаге параллельно с достоверным образцом в системах растворителей: изопропанол — вода — хлороформ (30:10:5) и н-бутанол — метанол — вода (10:1:4) нисходящим способом ( $R_f$  0.72 и 0.25, соответственно). Хроматограмму проявляли 25 % этанольным раствором кислоты фосфорновольфрамовой.

При просмотре в дневном свете обнаруживаются пятна эсцина бледно-вишневого цвета.

Для выяснения агликонового состава выделенного эсцина был проведен его кислотный гидролиз.

5.0 г полученного эсцина растворяли в 100 мл 96 % спирта, прибавляли 40 мл воды очищенной, 12 мл кислоты хлористоводородной концентрированной и гидролизовали на кипящей водяной бане в течение 3.5 ч. Полученный гидролизат охлаждали, прибавляли 200 мл воды очищенной, агликоны экстрагировали 200 мл хлороформа. После расслоения хлороформный слой отделяли и обрабатывали водой очищенной до нейтральной реакции. Хлороформное извлечение сушили над натрием сульфатом безводным, хлороформ отгоняли. Полученный остаток растворяли в 150 мл 5 % метанольного раствора калия гидроксида и нагревали в течении 1.5 ч в колбе с обратным холодильником. Затем смесь разбавляли водой, метанол отгоняли, агликоны из водного остатка извлекали тремя порциями, по 100 мл каждая, смеси хлороформ - этилацетат (1:1). Извлечения отмывали водой от щелочи и упаривали. Получено 2.2 г смеси

Таблица

**Тритерпеновые агликоны, полученные после кислотного гидролиза эсцина**

Агликоны	Общая формула	Тпл., °С	$[\alpha]_D$	$R_f^*$
эсцигенин	$C_{30}H_{48}O_5$	305-310	+56.0 (EtOH)	0.62
баррингтогенол D	$C_{30}H_{48}O_5$	304-311	+48.0 (диокс.)	0.66
баррингтогенол C	$C_{30}H_{48}O_4$	304-311	+34.0 (диокс.)	0.50
протоэсцигенин	$C_{30}H_{48}O_6$	303-310	+32.0 (диокс.)	0.42

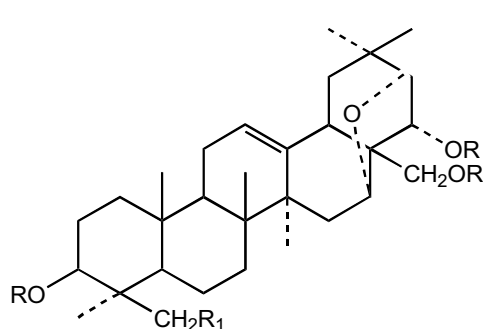
Примечания:

\* — система растворителей хлороформ-метанол (9:1);

EtOH — этанол;

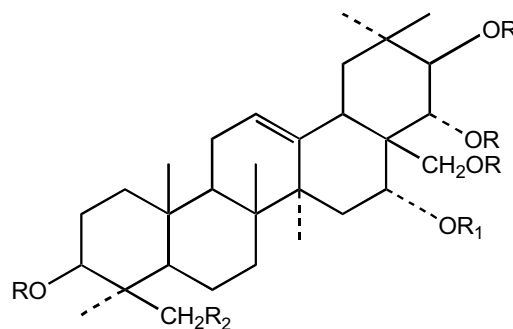
диокс. — диоксан.

Рисунок



R = H; R<sub>1</sub> = OH (эсцигенин)

R = R<sub>1</sub> = H (баррингтогенол D)



R = R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H (баррингтогенол C)

R = R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH (протоэсцигенин)

**Структурные формулы выделенных агликонов**



агликонов. Смесь агликонов разделяли на колонке, заполненной силикагелем. Колонку вначале элюировали хлороформом, затем смесью хлороформ - этанол (9.5:0.5) с увеличением содержания этанола до 50 %. Разделение контролировали на пластинках «Силуфол» в системе растворителей хлороформ-метанол (9:1).

В результате получены и идентифицированы агликоны: эсцигенин, баррингтогенол D, баррингтогенол C и протоэсцигенин (Таблица).

Водный остаток после извлечения агликонов нейтрализовали, упаривали и хроматографировали на бумаге (система растворителей н-бутанол — кислота уксусная — вода (4:1:2)) параллельно с достоверными образцами сахаров. В результате хроматографического исследования в маточнике обнаружены: D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза и D-глюкуроновая кислота.

#### Результаты и их обсуждение

В качестве растительного сырья для получения эсцина нами предложен околоплодник каштана конского. Разработан новый способ выделения эсцина путем его экстракции из околоплодника каштана конского н-бутанолом, насыщенным водой, с последующей очисткой целевого продукта алюминия оксидом. В результате из околоплодника каштана конского нами выделен эсцин с выходом 2.2 %.

Таким образом, кристаллический эсцин является суммой кислых тритерпеновых гликозидов, агликоновая часть которых представлена производными  $\Delta^{12}$ -олеанана [11]: эсцигенином, баррингтогенолом D, баррингтогенолом C и протоэсцигенином (Таблица, рисунок).

В качестве сахарных компонентов эсцина, как уже упоминалось, обнаружены D-глюкуроновая кислота, D-глюкоза, D-галактоза и D-ксилоза, основным из них являются D-глюкуроновая кислота и D-глюкоза.

#### Выводы

Изучен околоплодник каштана конского на содержание эсцина. Установлено, что содержание эсцина в данном сырье колеблется от 1.5 % до 2.5 %. Предложен метод выделения эсцина из сырья экстракцией н-бутанолом, насыщенным водой, с последующей очисткой целевого продукта на алюминия оксиде. После гидролиза выделенного эсцина идентифицированы агликоны эсцигенин, баррингтогенол D, баррингтогенол C и про-

тоэсцигенин и сахара D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза и D-глюкуроновая кислота.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Флора Азербайджана: В 8 т. - Т. VI. — Баку, 1955. — С. 185-186.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. - 13-е изд. - Т. 1. - Харьков, 1998. — С. 451-452.
3. Петков В. Современная фитотерапия. — София, 1988. — С. 111-114.
4. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям (Фитотерапия). — Москва, 1984. — С. 125-127.
5. Липиды семян *Aesculus hippocastanum* L. / Деркач А.И., Комиссаренко Н.Ф., Зинченко А.А. и др. // Фармаком. - 1995. - № 4. — С. 33-34.
6. Деркач А.И., Котов А.Г., Комиссаренко С.Н. Изучение некоторых биологически активных веществ семян *Aesculus hippocastanum* L. // Фармаком. - 1999. — № 5. — С. 17-21.
7. Меланины семян *Aesculus hippocastanum* L. / Комиссаренко Н.Ф., Деркач А.И., Черменова Г.В. и др. // Растительные ресурсы. - 1997. — Т. 33. - Вып. 2. — С. 56-58.
8. Мельничук О.П. Получение эсцина из семян конского каштана: Тр. Ленинградского химико-фармацевтического института. — Вопросы фармакогнозии. — 1961. - Т. 12. - С. 263-266.
9. Спиридонов В.Н., Прокопенко А.П., Колесников Д.Г. Фитохимическое изучение каштана конского. Сообщение 2. Выделение флавоноидов и сапонины эсцина из плодов. - Мед. пром-сть СССР. - 1963. - № 11. — С. 17-20.
10. Yoshikawa M., Harada E., Murakami T. et al. Escins Ia, Ib, IIa and IIIa bioactive triterpene oligoglycosides from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L., their inhibitory effect, ethanol absorption and hypoglycemic activity on glucose tolerance test // Chem. Pharm. Bull. - 1994. - Vol. 42, No. 6. - P. 1357-1359.
11. Yoshikawa M., Murakami T., Yamahara J. et al. Bioactive saponins glycosides. Horse Chestnut: Structures of Escins IIIb, IV, V and VI and isoescins Ia, Ib and V. Acylated Polyhydroxyoleanane Triterpene Oligoglycosides from the Seeds of Horse Chestnut Tree (*Aesculus hippocastanum* L. Hippocastanaceae) // Chem. Pharm. Bull. — 1998. - Vol. 46, No. 11. — P. 1764-1769.

#### Резюме

Керимов Ю.Б., Исаев Д.И., Деркач А.И.

#### Одержання та вивчення есцину з оплодня *Aesculus hippocastanum* L.

Вивчено оплодень рослини *Aesculus hippocastanum* L. як джерело одержання есцину. Установлено, що вміст есцину у сировині становить від 1.5 % до 2.5 %. Як метод виділення есцину із рослинної сировини запропоновано екстракцію н-бутанолом, насиченим водою. У результаті гідролізу встановлено, що виділений есцин представлено такими агликонами як есцигенин, барингтогенол D, барингтогенол C і протоесцигенин. Цукрова частина складається з D-глюкози, D-ксилози та D-глюкуронової кислоти.

#### Summary

Kerimov Yu.B., Isayev D.I., Derkach A.I.

#### Obtaining and study of escin from *Aesculus hippocastanum* L. pericarp

The pericarp of *Aesculus hippocastanum* L. as a source of escin obtaining was studied. It was established that herbal drugs contain not less than 1.5 per cent and not more than 2.5 per cent of escin. As a method of escin isolation

from herbal drugs the extraction by water saturated n-butanol was suggested. At the result of hydrolysis it was established that obtained escin is represented by such aglycons as escigenin, barringtogenol D, barringtogenol C and protoescigenin. Sugary part consists from D-glucose, D-galactose, D-xylose and D-glucuronic acid.

**Керимов Юсиф Балакерим оглы** (р. 1940). Окончил Азербайджанский государственный медицинский институт им. Н. Нариманова (1960). Д.фарм.н. Профессор. Зав. кафедрой фармакогнозии и ботаники Азербайджанского медицинского университета.

**Исаев Джаваншир Иса оглы** (р. 1963). Окончил Азербайджанский государственный медицинский институт им. Н. Нариманова (1988). К.фарм.н. Доцент кафедры фармакогнозии и ботаники Азербайджанского медицинского университета.

**Деркач Анатолий Иванович** (р.1950). Окончил Харьковский фармацевтический институт (1972). Работает в ГП ГНЦЛС (с 1973). К.фарм.н. (1989). Ст. науч. сотр. (1993). Зав. сектором природных гетероциклических соединений (2000).

## Синтез та вивчення фармакологічної дії

УДК 547.856.1

Нікітін В.О., Коваленко С.І., Белєнічев І.Ф.  
Запорізький державний медичний університет

### Синтез деяких похідних 2-метил-4(3Н)-хіназолону, їх фізико-хімічні та біологічні властивості

Встановлено, що 2-метил-4(3Н)-хіназолон вступає в реакцію конденсації Кньювенегеля із ароматичними, гетероциклическими альдегідами та ізатином. Для синтезованих сполук вивчені фізико-хімічні та спектральні характеристики. Останні показали, що реакція триває стереоселективно з утворенням транс-ізомерів. Вихід продукту в більшості випадків функціонально пов'язаний із величиною енергії НВМО вихідної карбонільної сполуки. Одна із синтезованих сполук виявила антиамнестичну активність на рівні препарату порівняння; деякі виявили виражену антиоксидантну дію.

Арсенал сучасного хіміка-синтетика складають сотні різних реакцій і перегрупувань, які застосовують для моделювання молекул із метою створення нових біологічно активних речовин. Така розмаїтість можлива завдяки підбору та систематизації великого фактичного матеріалу про реакційну здатність різних класів сполук. Виходячи з вищезазначеного, нами була здійснена спроба вивчити реакцію конденсації 2-метил-4(3Н)-хіназолону з різними карбонільними сполуками та визначити, як впливає їх будова на реакційну здатність. Актуальності подібному дослідженню надає також факт наявності у хіназолонів біологічної активності [3, 5, 8-12].

Метою роботи є синтез деяких конденсованих похідних 2-метил-4(3Н)-хіназолону, вивчення їх фізико-хімічних властивостей, встановлення факторів, що мають вирішальний вплив на перебіг конденсації, вивчення антиамнестичної та антиоксидантної активності синтезованих сполук.

#### Результати та їх обговорення

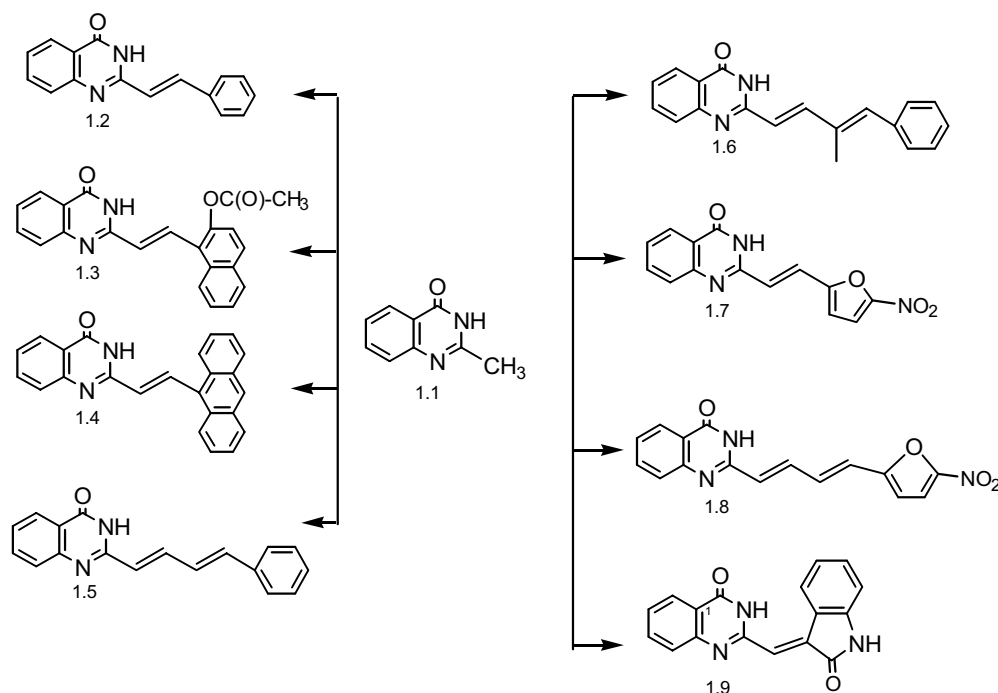
Взаємодію 2-метил-4(3Н)-хіназолону (1.1) із карбонільними сполуками проводили в умовах реакції Кньювенегеля (кислота оцто-

ва концентрована у присутності натрію ацетату безводного). Результати досліджень показали, що кетони та аліфатичні альдегіди не вступають у реакцію конденсації, що ми пов'язували зі стеричними перешкодами, а також із низькими електрофільними властивостями даних карбонільних сполук. На нашу думку, можливе й інше пояснення, а саме: реакція має місце тільки у разі утворення нової спряженої системи, що є енергетично вигідним процесом, а для взаємодії з іншими карбонільними реагентами 2-метил-4(3Н)-хіназолон не є достатньо активним метиленовим реагентом.

Зазначене звузило пошук до вивчення конденсації 2-метил-4(3Н)-хіназолону (1.1) з ароматичними, гетероциклическими альдегідами та ізатином. Так, взаємодія вихідної сполуки (1.1) із бензальдегідом у зазначених умовах проходить протягом 6 год (контролювали хроматографічно) із виходом кінцевого продукту 80 % (Схема).

Реакція 2-метил-4(3Н)-хіназолону (Схема, 1.1) із конденсованими ароматичними альдегідами ( $\beta$ -оксинафтаальдегідом, 9-антраальдегідом) проходить значно швидше (1.5-3 год) і з більш високими виходами (87 % і

Схема



84.4 %, відповідно). Крім цього встановлено, що при взаємодії з β-оксинафталдегідом, окрім реакції конденсації, за даних умов проходить реакція ацилювання з утворенням 2-[2-(ацетоксинафтил-1)-етеніл]-хіназолін-(3Н)-4-ону (Схема, 1.3).

Що ж стосується гетероциклічних альдегідів та ізатину, то загальними характерними рисами була наявність видимого ефекту реакції, що виявлявся вже протягом перших 5-20 хв у вигляді випадання густого осаду, а також практично кількісні виходи (85 %-98.6 %). Взаємодія із коричневим та метилкоричневим альдегідами потребувала більшого часу та подальшого очищення продукту від реагенту, який не прореагував, що вплинуло на кінцеві виходи.

Синтезовані сполуки (Табл. 1, 1.1-1.9) — білі (1.1, 1.2, 1.6), жовті (1.4, 1.5), жовтогарячі (1.3), червоні (1.9), чорні (1.8) або коричневі (1.7) кристалічні речовини, нерозчинні у воді, ацетоні та ефірі, розчинні у спирті, діоксані, ДМФА (сполука 1.8 розчинна тільки в ДМФА). Для аналізу синтезовані сполуки були очищені кристалізацією із діоксану - 1.3-1.6, суміші діоксан - вода (6:1) — 1.2, суміші ДМФА - вода (1:2) — 1.7, ДМФА — 1.8, 1.9.

Будову синтезованих сполук підтверджено за допомогою УФ-, ІЧ-, ПМР-спектроскопії та елементним аналізом, чистоту — тонкошаровою хроматографією (Табл. 1, 2). УФ-спектр 2-метил-4(3Н)-хіназолону (1.1) характеризується чотирма максимумами поглинання середньої інтенсивності довжин хвиль

Таблиця 1

**Фізико-хімічні властивості синтезованих сполук**

Сполука	Т.пл., °С	Вихід, %	Знайдено, % N	Емпірична формула*	Вирахувано, % N
1.1	233-234	84	17.50	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O	17.49
1.2	250-252	80.0	11.29	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	11.28
1.3	264-266	87.0	7.84	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	7.86
1.4	>300	84.4	8.05	C <sub>24</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	8.04
1.5	250-252	62.0	10.20	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O	10.21
1.6	248-250	29.5	9.70	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	9.72
1.7	291-293	84.8	14.86	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	14.84
1.8	>300	98.6	13.57	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	13.59
1.9	298-300	90.3	14.54	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	14.53

Примітка.

\* — фізико-хімічні властивості сполук 1.1, 1.2 відповідають даним літератури [3, 5, 12, 13].

Таблиця 2

УФ-, ІЧ- та <sup>1</sup>H ПМР-спектри синтезованих сполук

Сполука	<sup>1</sup> H ПМР, δ(м.ч.), J (Гц)
1.1	12.382 (с., 1H, NH); 7.269, 6.237 (д., 1H, J 8.1 Гц, H <sup>5</sup> -H <sup>8</sup> хін.); 6.393, 6.107 (т., 1H, H <sup>6</sup> -H <sup>7</sup> хін.); 1.176 (с., 3H, CH <sub>3</sub> )
1.2	12.173 (с., 1H, NH); 8.110, 7.602 (д., 1H, H <sup>5</sup> -H <sup>8</sup> хін.); 7.95, 6.89 (д., 1H, J 16.5 Гц, CH=CH); 7.667, 7.302 (т., 1H, H <sup>6</sup> -H <sup>7</sup> хін.); 7.589, 7.362 (д., 2H, H <sup>2</sup> , H <sup>3</sup> , H <sup>5</sup> , H <sup>6</sup> фен.); 7.374 (м., 1H, H <sup>5</sup> фен.)
1.3	12.49 (с., 1H, NH); 8.38, 6.93 (д., 1H, J 18.5 Гц, CH=CH), 8.34 (д., 1H, H <sup>5</sup> хін.); 8.16 (д., 1H, H <sup>8</sup> нафт.); 7.86 (т., 1H, H <sup>7</sup> хін.); 7.85 (д., 1H, H <sup>3</sup> нафт.); 7.69 (д., 2H, H <sup>8</sup> хін., H <sup>4</sup> нафт.); 7.58 (т., 1H, H <sup>6</sup> нафт.); 7.49 (т., 1H, H <sup>6</sup> хін.); 7.40 (т., 1H, H <sup>7</sup> нафт.); 7.25 (д., 1H, H <sup>5</sup> нафт.); 2.40 (с., 3H, CH <sub>3</sub> )
1.4	12.49 (с., 1H, NH); 8.83, 6.88 (д., 1H, J 16.8 Гц, CH=CH), 8.54 (с., 1H, H <sup>10</sup> антр.); 8.42 (д., 2H, H <sup>4</sup> , H <sup>5</sup> антр.); 8.20 (с., 1H, H <sup>5</sup> хін.); 8.06 (д., 2H, H <sup>1</sup> , H <sup>8</sup> антр.); 7.78, 7.74 (т., 1H, H <sup>6</sup> антр., H <sup>7</sup> хін.); 7.53 (м., 5H, H <sup>6</sup> , H <sup>8</sup> хін., H <sup>2</sup> , H <sup>3</sup> , H <sup>7</sup> антр.)
1.5	12.08 (с., 1H, NH); 8.146 (д., 1H, H <sup>5</sup> хін.), 7.854, 6.50 (д., 1H, J 16.2 Гц, CH=CH); 7.76 (д., 2H, H <sup>2</sup> , H <sup>6</sup> фен.); 7.68 (т., 1H, H <sup>7</sup> хін.); 7.62 (т., 1H, H <sup>4</sup> фен.); 7.38 (м., 5H, H <sup>6</sup> , H <sup>8</sup> хін., H <sup>3</sup> , H <sup>5</sup> фен., Ph-CH <sub>2</sub> )
1.6	12.40 (с., 1H, NH); 8.95 (д., 1H, H <sup>5</sup> хін.), 7.814, 6.50 (д., 1H, J 16.2 Гц, CH=CH); 7.81 (д., 1H, H <sup>6</sup> фен.); 7.61 (д., 1H, H <sup>2</sup> фен.); 7.442 (м., 6H, аром); 7.001 (с., 1H, Ph-CH <sub>2</sub> ); 2.087 (с., 3H, CH <sub>3</sub> )
1.7	12.27 (с., 1H, NH); 8.26, 8.02 (м., аром.); 8.07, 7.6 (д., 1H, H <sup>5</sup> -H <sup>8</sup> хін.); 7.93 та 6.92 (д., 1H, CH=CH); 7.80, 7.49 (т., 1H, H <sup>6</sup> -H <sup>7</sup> хін.); 7.53 (с., 1H., Ph-CH <sub>2</sub> )
1.9	14.309 (с., 1H, NH ізат.); 11.380 (с., 1H, NH хін.); 8.161 (д., 1H, H <sup>5</sup> хін.); 7.862 (м., 2H, H <sup>7</sup> хін., H <sup>7</sup> ізат.); 7.770 (д., 1H, H <sup>8</sup> хін.); 7.583 (т., 1H, H <sup>6</sup> хін.); 7.506 (с., 1H, -CH=); 7.350 (т., 1H, H <sup>6</sup> ізат.); 7.076 (т., 1H, H <sup>5</sup> ізат.); 6.911 (д., H <sup>4</sup> ізат.)

223 нм (lgε = 4.30), 260 нм (lgε = 3.89), 320 нм (lgε = 3.71), 324 нм (lgε = 3.78) [5]. Спектральна картина спряженої системи 2-стирил-4(3H)-хіназолону (1.2) характеризується підвищенням інтенсивності та значним батохромним зсувом смуг поглинання (324 нм, lgε = 4.22), що відповідає π→π\*-переходу в даній системі.

ІЧ-спектри сполуки 1.1 мають характеристичні валентні коливання NH-групи за довжин хвиль 3480-3220 см<sup>-1</sup>, СО-групи — 1720-1680 см<sup>-1</sup> та CN-групи — 1340 см<sup>-1</sup>. Синтезовані сполуки (1.2-1.8), окрім коливань зазначених функціональних груп, мають смуги коливань вільної групи (ν CH=CH) в межах довжин хвиль 690-675 см<sup>-1</sup>, що характерно для транс-ізомерів.

ПМР-спектр сполук 1.1-1.9 характеризується класичним набором сигналів протонів ароматичної системи та протону в положенні 3 хіназоліну (12.49-11.38 м.ч.). Крім того, наявність у спектрах сполук 1.2-1.8 сигналів протонів етенільного чи бутадієнільного залишку з константою спіні-спінової взаємодії (KССВ) 16.0-16.25 Гц дозволяє зробити висновок, що конденсація карбонільних спо-

лук із 2-метил-4(3H)-хіназолоном триває стереоселективно з утворенням транс-ізомерів.

Із метою визначення факторів, що впливають на здатність зазначених карбонільних сполук вступати в реакцію конденсації із 2-метил-4(3H)-хіназолоном, нами був проведений множинний регресійний аналіз. В якості факторних ознак було обрано енергію нижньої вакантної молекулярної орбіталі (НВМО) і заряд на атомі вуглецю карбонільного фрагмента; в якості результативної ознаки — вихід продукту реакції. Для уникнення серйозних помилок із вибірки довелося виключити декілька значень: 5-нітрофурфуролу — бо в реакцію цей реагент вводився у вигляді діацетату (не виконується умова однорідності вибірки), та коричневого і метилкоричного альдегідів — бо мали місце проблеми із виділенням кінцевого продукту, що могло істотно вплинути на вихід (вплив стороннього фактора).

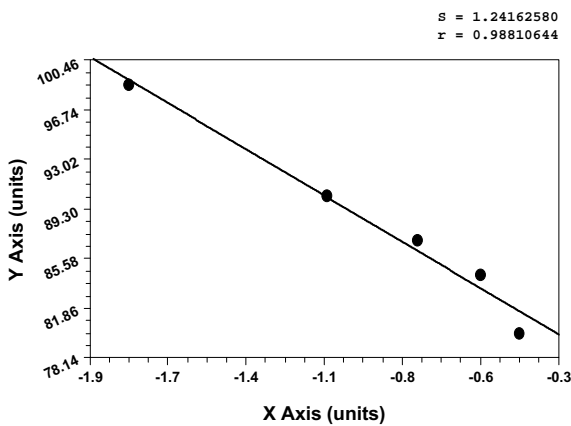
Результати множинного регресійного аналізу показали, що коливання результативної ознаки на 97.63 % пов'язано із величиною енергій НВМО реагенту, та всього на 0.01 % - із величиною заряду на карбонільному атомі

Таблиця 3

Кореляційна матриця (дані нормовано)

	заряд	НВМО	вихід
заряд	1000	0.312	-0.309
НВМО	0.312	1000	-0.988
вихід	-0.309	-0.988	1000

Рисунок



**Результати парного регресійного аналізу залежності виходу від енергії НВМО**

вуглецю, причому ступінь взаємозв'язку НВМО — заряд більша ніж заряд — вихід, на що вказує кореляційна матриця (Табл. 3).

Результати парного регресійного аналізу залежності виходу від енергії НВМО показали, що між цими величинами має місце зворотній функціональний зв'язок (Рисунок).

Це підтверджує припущення про те, що реакція конденсації 2-метил-4(3Н)-хіназолону із карбонільними сполуками проходить під орбітальним контролем.

Аналіз результатів антиоксидантної активності на моделі неферментативного ініціювання вільнорадикального окиснення (ВРО) показав (Табл. 4), що деякі з похідних виявляють значну активність: так продукт конденсації із коричним альдегідом перевищив активність дибунолу в 1.2 рази; із 5-нітрофурфуолом — в 1.5 рази, а похідне антралю — більше ніж у 2 рази.

Дане ствердження узгоджується з дослідженнями деяких авторів [1, 8], в яких зазначається, що молекули, які мають спряжені зв'язки, є більш ефективними пастками активних форм кисню та вільних радикалів.

За результатами дослідження умовної реакції пасивного уникання можна стверджувати (Табл. 5), що конденсація 2-метил-4(3Н)-хіназолону із карбонільними сполуками призводить до зменшення або, навіть, повного зникнення антиамнестичної дії. Так, вихідна сполука дещо перевищувала за ефектом пірацетам, проте із досліджених похідних тільки [2-(антраніл-9)-етеніл]-хіназолін-(3Н)-4-он (1.4) виявив активність на рівні препарату порівняння, всі інші ж, на нашу думку, навряд чи є перспективними для створення ноотропних препаратів.

Оскільки чіткого кореляційного зв'язку між антиоксидантною й антиамнестичною

Таблиця 4

**Антиоксидантна активність синтезованих сполук**

Сполука	Неферментативне ініціювання ВРО**	
	МДА, ммоль/мл	АОА, %
інтакт	1.25 ± 0.16	—
контроль	5.06 ± 0.09	—
1.2	4.58 ± 0.08	9.49
інтакт	1.25 ± 0.16	—
контроль	5.06 ± 0.09	—
1.1	4.10 ± 0.25*	18.97
1.3	3.90 ± 0.09*	22.92
1.4	2.28 ± 0.27*	54.94
1.5	3.45 ± 0.09*	31.81
1.7	2.95 ± 0.10*	41.70
1.8	4.18 ± 0.08*	17.39
1.9	4.45 ± 0.09*	12.06
дибунол	3.39 ± 0.07*	26.50

**Примітки:**

\* — достовірно по відношенню до контролю ( $p \leq 0.05$ );

\*\* — досліджувані сполуки при неферментативному ініціюванні ВРО [6] вивчали в дозах 1.5 мкмоль/мл; дибунол додавали в дозі 3.0 мкмоль/мл.

Таблиця 5

## Антиамнестична активність синтезованих сполук

Сполука**	Антиамнестична активність*	
	УРПУ (M ± m, хв.)	%, змін
інтакт (навчання)	129.5 ± 29.3	-
контроль (навчання + амнезія)	16.35 ± 1.38	-
1.2	40.75 ± 3.49*	59.88
інтакт (навчання)	107.6 ± 29.50	-
контроль (навчання + амнезія)	9.2 ± 2.22	-
1.1	88.6 ± 3.33*	89.61
1.3	41.4 ± 1.55*	77.78
1.4	82.0 ± 2.52*	88.78
1.5	23.2 ± 1.46*	60.34
1.7	14.4 ± 1.03*	36.11
1.8	12.8 ± 1.20	28.13
1.9	43.2 ± 4.46*	78.70
пірацетам	80.3 ± 2.2*	88.54

Примітки:

\* — достовірно по відношенню до контролю ( $p \leq 0.05$ );

\*\* — кількість тварин у кожному досліді ( $n = 6$ ).

активністю не було виявлено, то на дію синтезованих сполук на процеси формування пам'яті важливий вплив мають й інші механізми, що потребує подальшого дослідження.

#### Експериментальна хімічна частина

УФ-спектри синтезованих сполук знято на спектрофотометрі СФ-26 у воді (1.1), ДМФА (1.2), ІЧ-спектри — на спектрофотометрі UR-20 «Specord» в області довжин хвиль 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  у дисках із калію бромідом, ПМР-спектри — на спектрофотометрі ядерного магнітного резонансу «Varian VXR-300», розчинник —  $\text{DMSO-D}_6$ , стандарт — тетраметилсилан.

Для розрахунку квантово-механічних характеристик молекул (зарядів, енергії НВМО) використовували програму HyperChem® (метод AM1); для проведення статистичних досліджень — StepRegression для Excel 2000 та CurveExpert 1.3.

2-Метил-4-(3Н)-хіназолон синтезовано за відомою методикою з константами, які відповідають даним літератури [2, 13].

2-Стирил-4-(3Н)-хіназолон (Табл. 1, 1.2) До розчину, утвореного з 1.6 г (0.01 моль) 2-метилхіназолону-4 (1.1) і 1.23 г (0.015 моль) натрію ацетату безводного в 10 мл кислоти оцтової концентрованої, додають 1.06 г (0.01 моль) бензальдегіду. Реакційну суміш кип'ятять протягом 6 год. Охолоджують, вливають у холодну воду, утворені осадки відфільтровують. Сушать.

#### 2-[2-(Ацетоксинафтил-1)-етеніл]-хіназолін-(3Н)-4-он (Табл. 1, 1.3)

До розчину, утвореного з 1.6 г (0.01 моль) 2-метилхіназолону-4 (1.1) і 1.23 г (0.015 моль) натрію ацетату безводного у 20 мл кислоти оцтової концентрованої, додають 1.72 г (0.01 моль) нафталдегіду. Реакційну суміш кип'ятять протягом 3 год. Охолоджують, вливають у холодну воду, утворені осадки відфільтровують. Сушать.

#### 2-(Антраіл-9)-етеніл]-хіназолін-(3Н)-4-он (Табл. 1, 1.4)

До розчину, утвореного з 1.6 г (0.01 моль) 2-метилхіназолону-4 (1.1) і 1.23 г (0.015 моль) натрію ацетату безводного у 20 мл кислоти оцтової концентрованої, додають 2.06 г (0.01 моль) антраілдегіду. Реакційну суміш кип'ятять протягом 3 год. Охолоджують, вливають у холодну воду, утворені осадки відфільтровують. Сушать.

#### 2-[4-Феніл-3-бутадієн-1,3-іл-1]-хіназолін-(3Н)-4-он (Табл. 1, 1.5)

До розчину, утвореного з 1.6 г (0.01 моль) 2-метилхіназолону-4 (1.1) і 1.23 г (0.015 моль) натрію ацетату безводного у 20 мл кислоти оцтової концентрованої, додають 1.32 г (0.01 моль) коричневого альдегіду. Реакційну суміш кип'ятять протягом 3.5 год. Охолоджують, вливають у холодну воду, утворені осадки відфільтровують. При необхідності промивають невеликою кількістю ефіру. Сушать.

#### 2-[3-Метил-4-феніл-3-бутадієн-1,3-іл-1]-хіназолін-(3Н)-4-он (Табл. 1, 1.6)

До розчину, утвореного з 1.6 г (0.01 моль) 2-метилхіназолону-4 (1.1) і 1.23 г (0.015 моль) натрію ацетату безводного в 10 мл кислоти оцтової концентрованої, додають 1.46 г (0.01 моль)  $\alpha$ -метилкоричного альдегіду. Реакційну суміш кип'яють протягом 12 год. Охолоджують, вливають у холодну воду, утворені осаді відфільтровують. При необхідності промивають невеликою кількістю ефіру. Сушать.

[2-(5-Нітрофурил-2)-етеніл]-хіназолін-(3Н)-4-он (Табл. 1, 1.7)

1.6 г (0.01 моль) 2-метилхіназолону-4 (1.1) розчиняють у 10 мл кислоти оцтової концентрованої, додають 2.46 г (0.03 моль) натрію ацетату безводного, 1.4 г (0.01 моль) 5-нітрофурфуролу діацетату і кип'яють протягом 3 год. Охолоджують, вливають у холодну воду, утворені осаді відфільтровують. Сушать.

[2-(5-Нітрофурил-2)-1,4-бутадієніл-1]-хіназолін-(3Н)-4-он (Табл. 1, 1.8)

До розчину, утвореного з 0.8 г (0.005 моль) 2-метилхіназолону-4 (1.1) у 10 мл кислоти оцтової, додають 0.83 г (0.005 моль)  $\beta$ -(5-нітрофурфуріл-2)-акролеїну та кип'яють протягом 3 год. Охолоджують, вливають у холодну воду, утворені осаді відфільтровують. Сушать.

2-(2,3-Дигідроіндолон-2-іліден-3)-метилхіназолін-(3Н)-4-он (Табл. 1, 1.9)

До 0.8 г (0.005 моль) 2-метилхіназолону-4 (1.1) у 10 мл оцтового ангідриду додають 0.73 г (0.005 моль) ізатину. Реакційну суміш кип'яють протягом 3 год. Охолоджують, вливають у холодну воду, утворені осаді відфільтровують. Сушать.

#### Експериментальна біологічна частина

Вивчення антиоксидантної активності (АОА) сполук у дослідях *in vitro* проводили на моделі неферментативного ініціювання вільнорадикального перекисного окиснення (ВРПО) у суспензії яйцевих ліпопротеїдів при додаванні заліза (II) сульфату [6]. (Визначення проводили на спектрофотометрі СФ-46). АОА оцінювали у відсотках гальмування утворення кінцевого продукту ВРПО – малового діальдегіду (МДА) [5] та обчислювали за формулою:

$$AOA = \frac{C_k - C_o}{C_k} \cdot 100 \%,$$

де:

$C_k$  — концентрація МДА у контрольному досліді;

$C_o$  — концентрація МДА в основному досліді.

Антиамнестичну активність вивчали на білих щурах лінії Вістар, масою 220-260 г, одержаних із віварію Інституту фармакології і токсикології АМН України. Тварини утримувалися на стандартному раціоні харчування. Дослідження проведено із дотриманням правил гуманного поводження із тваринами згідно з Директивою Ради ЄС із питань захисту тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [7]. Антиамнестичну активність оцінювати за ступенем збереження умовної реакції пасивного уникання (УРПУ) [4, 14]. Із цією метою тварин поміщали у світлий відсік двокамерної установки і реєстрували латентний період заходу в темний відсік камери, де щури одержували однократний удар струмом крізь електродну підлогу (навчання). Амнезію викликали внутрішньочеревинним введенням атропіну в дозі 40.0 мг/кг [2]. Відтворення рефлексу здійснювали через 24 год після навчання. Досліджувані сполуки вводили в дозі 10 мг/кг *per os* за 60 хв до навчання у вигляді суспензії, стабілізованої твіном-80; препарат порівняння - пірацетам (ВАТ «Галичфарм») — у дозі 200.0 мг/кг у мінімальній кількості води. Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програми «Biostatistica».

#### Висновки

1. Здійснено конденсацію 2-метил-4(3Н)-хіназолону із карбонільними сполуками в умовах реакції Кньюенагеля. Ефективними реагентами виявилися лише ароматичні, гетероциклічні альдегіди та ізатин.

2. Для синтезованих сполук вивчено фізико-хімічні та спектральні характеристики, останні показали, що реакція триває стереоселективно з утворенням транс-ізомерів.

3. Встановлено, що на вихід кінцевого продукту вирішальний вплив має енергія НВМО карбонільного реагенту - це дає підстави вважати, що взаємодія проходить під орбітальним контролем.

4. Проведені біологічні дослідження показали наявність вираженої антиоксидантної активності (на моделі неферментативного ініціювання ВРО) у деяких похідних. Щодо антиамнестичного ефекту, то тільки одна сполука виявила активність на рівні препарату порівняння.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Беліничев І.Ф., Коваленко С.І., Дунаєв В.В. Антиоксиданти: сучасне уявлення, перспективи створення // Ліки. — 2002. — № 1. — С. 25-29.

2. Буреш Я., Бурешова О. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. — М.: Высшая школа, 1991. — 399 с.
3. Брасюкас В.Б. Синтез и биологическая активность функциональных производных би- и полициклических азиннов; Дис. ... д.фарм.н. — Каунас, 1989. — 355 с.
4. Громов Л.А. Нейропептиды. — Киев: Здоров'я, 1992. — 248 с.
5. Коваленко С.І. Синтез, перетворення, фізико-хімічні і біологічні властивості похідних хіназолону-4 та 4-амінохіназоліну; Автореф. дис. ... д.фарм.н. - Львов, 2000. - 38 с.
6. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів у досліджах *in vitro*. Методичні рекомендації / Ю.І. Губський, В.В. Дунаєв, І.Ф. Беленічев та ін. — Київ: Державний Фармакологічний центр МОЗ України, 2002. — 26 с.
7. Надлежащая производственная практика лекарственных средств / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загория, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. - К.: МОРИОН, 1999. - С. 508-545.
8. Нейропротективні ефекти 4-іліденгідразінохіназолінів в умовах моделювання судом та амнезії / Н.О. Нестерова, І.Ф. Беленічев, С.І. Коваленко, О.В. Карпенко // Ліки. - 2004. - № 1-2. - С. 65-69.
9. Коваленко С.І., Беленічев І.Ф., Бухтиярова Н.В. Производные хиназолина — перспективные нейропротективные средства с антиоксидантным механизмом действия // Запорожский медицинский журнал. - 2004. - Т. 2, № 1. - С. 9-15.
10. Синяк Р.С. Синтез, превращения, физико-химические и биологические свойства N- и S-замещенных хиназолина; Автореф. дис. ... д.фарм.н. - Харьков, 1989. - 41 с.
11. Сидорова І.В., Беленічев І.Ф., Коваленко С.І. Стратегія цілеспрямованого пошуку лікарських засобів церебропротективної дії // Вісник фармакології та фармації. - 2004. - № 9. - С. 22-25.
12. Search for substances with antioxidant and anti-amnesic activities among 2-substituted 4-(3H)-quinazolones / Kovalenko S., Belenichev I., Nikitin V., Karpenko A. // Acta Polonae Pharmaceutica — 2003. - Vol. 60, No. 4. - P. 275-279.
13. Niementowski St. Synthesen von Chinazolin Verbindungen // J. prakt. Chem. — 1895. — Bd. 51, No. 2. — S. 564-572.
14. Nootropyl. Basic scientific and clinical date. — Brussels: USB, 1977. — 260 p.

#### Резюме

Никитин В.А., Коваленко С.І., Беленічев І.Ф.

#### Синтез некоторых производных 2-метил-4(3H)-хиназолон, их физико-химические и биологические свойства

Установлено, что 2-метил-4(3H)-хиназолон вступает в реакцию конденсации Кнёвенагеля с ароматичес-

кими, гетероциклическими альдегидами и изатинном. Для синтезированных соединений исследованы физико-химические и спектральные характеристики. Последние показали, что реакция протекает стереоселективно с образованием транс-изомеров. Выход продукта в большинстве случаев функционально связан с величиной энергии НВМО исходного карбонильного соединения. Одно из синтезированных соединений проявило антиамнестическую активность на уровне препарата сравнения; некоторые проявили выраженное антиоксидантное действие.

#### Summary

Nikitin V.A., Kovalenko S.I., Belenichev I.F.

#### The synthesis of some 2-methyl-4(3H)-quinazolone derivatives, their physicochemical and biological properties

It was established that 2-methyl-4(3H)-quinazolone goes in Knoevenagel's reaction of condensation with aromatic, heterocyclic aldehydes and isatin. Physicochemical and spectral characteristics of synthesized compounds were studied; the last showed that the reaction proceeded stereoselectively with trans-isomers formation. In most cases the product yield functionally concerned with the of LUMO energy value of mother carbonyl compound. One of the synthesized compounds had anti-amnesic activity at the level of reference preparation; some showed expressed antioxidant effect.

**Нікітін Владислав Олександрович.** Закінчив фармацевтичний факультет Запорізького державного медичного університету (2002), магістратуру при ЗДМУ (2003). Аспірант кафедри фармацевтичної хімії ЗДМУ.

**Коваленко Сергій Іванович.** Закінчив фармацевтичний факультет Запорізького державного медичного університету (1985) Д.фарм.н. (2002). Професор кафедри фармацевтичної хімії ЗДМУ.

**Беленічев Ігор Федорович.** Закінчив фармацевтичний факультет Запорізького державного медичного університету (1988). Д.б.н. (2003). Доцент (2003) кафедри фармакології і медичної рецептури ЗДМУ.



## Фармакологічні дослідження

УДК 615.015.14

Орлова И.Н.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

### Изучение фармакокинетики гифларина — инъекционного препарата гипозотемического действия

В экспериментах на кроликах изучена фармакокинетика оригинального препарата гипозотемического и диуретического действия — гифларин, содержащего в качестве действующего вещества флавоноид гиперозид. Показано, что фармакокинетика гиперозида характеризуется быстрым падением его уровня в крови, небольшими значениями времени полувыведения и времени удерживания в крови, что обусловлено быстрым распределением гиперозида по тканям и одновременным его метаболизмом. Динамика изменения концентрации гиперозида является двухфазной, что характерно для веществ флавоноидной природы.

За последние годы наблюдается рост нефрологических заболеваний. При этом отмечается уменьшение острых форм и преобладание больных с недостаточностью функций почек: нарушением белкового, водно-солевого и минерального обмена. Лечение указанных расстройств обменных процессов направлено на уменьшение образования конечных продуктов белкового обмена, усиление диуретической функции почек с целью устранения задержки указанных продуктов обмена в организме [1].

Гифларин, раствор для инъекций 1 % - оригинальный отечественный препарат гипозотемического и диуретического действия, разработанный в ГП ГНЦЛС [1, 2].

Гифларин обладает комплексом фармакотерапевтических свойств, позволяющих успешно влиять на главные звенья патогенеза почечной недостаточности. Основными из них являются: гипозотемическое, анаболическое и антикатаболическое действие, направленное на регулирование нарушений метаболизма белка при заболеваниях почек, благодаря чему уменьшается или устраняется уремия. Препарат регулирует диурез, парциальные процессы мочеобразования, почечную гемодинамику, азотовыделение, экскрецию электролитов. Гифларин оказывает также противовоспалительный, капилляроукрепляющий, обезболивающий и антиоксидантный эффекты [1, 2, 3].

Действующее вещество этого препарата - флавоногликозид гиперозид (3- d-1-галоктазид кверцетина), получаемый из различных видов зверобоя. Гиперозид проявляет наиболее выраженную гипозотемическую активность среди других индивидуальных флавоноидов кверцетиновой группы [1, 4, 5].

Анализ литературы свидетельствует, что большинство работ связано с фармакологическими и биохимическим аспектами действия гиперозида и практически отсутствуют работы по его фармакокинетике. Известно, что для веществ флавоноидной природы характерен быстрый метаболизм, экскреция осуществляется главным образом через энтерогепатический цикл, и лишь незначительная часть флавоноидов, поступивших в организм, выводится с мочой [1, 6, 7, 8].

Целью настоящей работы явилось изучение фармакокинетики гифларина при его внутривенном введении.

#### Материалы и методы

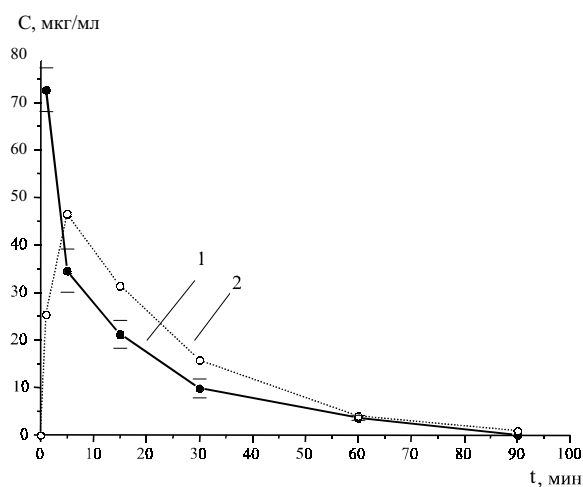
Фармакокинетику Гифларина, раствора для инъекций 1 %, исследовали на половозрелых кроликах массой 2.2 - 2.7 кг (средняя масса — 2.5 кг) по показателям концентрации гиперозида.

Препарат вводили однократно внутривенно в краевую вену уха кролика в дозе 20 мг/кг (по гиперозиду). Кровь для анализа отбирали в динамике: через 1 мин, 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин и 90 мин после введения.

Для количественного определения гиперозида в плазме крови использовали спектрофотометрический метод с батохромным сдвигом после экстракции лекарственного вещества из плазмы и образования окрашенного комплекса с алюминия хлоридом [9]. Оптическую плотность измеряли при длине волны 430 нм на спектрофотометре СФ-46.

Расчет концентрации гифларина в плазме проводили по калибровочной прямой, построенной методом наименьших квадратов в координатах: оптическая плотность гифларина — концентрация.

Рисунок



**Фармакокинетическая кривая гиперозид в плазме крови (1) и теоретическая кривая, характеризующая зависимость изменения концентрации гиперозид в периферическом пуле (2) после внутривенного введения препарата**

Фармакокинетические параметры рассчитывали модельно-независимым методом статистических моментов с использованием прикладных программ M-IND [10] и методом последовательного логарифмирования в рамках двухчастевой модели [11]. Рассчитывали следующие фармакокинетические параметры: концентрация препарата в нулевой момент времени  $C_0$ , кажущийся удельный

объем распределения в центральном и периферическом пуле  $V_0$  и  $V_p$ , стационарный объем распределения  $V_{ss}$ , константа элиминации  $K_{el}$ , период полувыведения препарата  $T_{1/2}$ , общий клиренс  $Cl_t$ , среднее время удержания в крови  $MRT$ , среднее время удержания в центральном и периферическом пуле  $MRT_0$  и  $MRT_p$ , площадь под фармакокинетической кривой в пределах от 0 до  $\infty$  -  $AUC^{0 \rightarrow \infty}$ , коэффициенты и комплексные параметры биэкспоненциального уравнения  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $\alpha$  и  $\beta$ , константы скоростей процессов переноса гифларина из центральной камеры в периферическую и обратно  $K_{12}$  и  $K_{21}$ .

#### Результаты и их обсуждение

Результаты определения концентрации гифларина при внутривенном введении представлены на Рисунке.

Как видно, фармакокинетическая кривая гиперозид характеризуется быстрым падением концентрации лекарственного вещества в крови. В течение первых 5 мин уровень гиперозид снижается более чем в два раза (с 72.7 мкг/мл до 34.6 мкг/мл), к 30 мин его концентрация составляет 9.8 мкг/мл, а через 1.5 ч гиперозид в крови не регистрируется. Снижение концентрации носит двухфазный характер. Наличие  $\alpha$ -фазы свидетельствует о начальном быстром распределении гиперозид в тканях организма. Индивидуальная вариабельность концентраций гиперозид в крови составляет (16-50) %.

Таблица

**Параметры фармакокинетики гиперозид**

Параметры фармакокинетики	Метод статистических моментов	Метод последовательного логарифмирования
$C_0$ , мкг/мл	131.7	-
$MRT$ , мин	17.17	-
$MRT_0$ , мин	8.29	-
$MRT_p$ , мин	8.89	-
$K_{el}$ , мин <sup>-1</sup>	0.152	0.12
$T_{1/2}$ , мин	4.58	15
$Cl_t$ , л/мин·кг	0.02	0.02
$V$ , л/кг	0.33	0.38
$V_0$ , л/кг	0.16	0.17
$V_p$ , л/кг	0.17	-
$A_1$ , мкг/мл	-	79.8
$A_2$ , мкг/мл	-	39.8
$\alpha$ , мин <sup>-1</sup>	-	0.600
$\beta$ , мин <sup>-1</sup>	-	0.046
$K_{12}$ , мин <sup>-1</sup>	-	0.29
$K_{21}$ , мин <sup>-1</sup>	-	0.23
$AUC^{0 \rightarrow \infty}$ , мкг·ч/мл	1086.6	1049.9

В Таблице представлены модельно-независимые фармакокинетические параметры гиперозида, рассчитанные методом статистических моментов и в рамках двухчастевой модели.

Из приведенных данных видно, что гиперозид непродолжительно циркулирует в крови: среднее время удерживания составляет 17.2 мин, для центрального пула  $MRT_0 = 8.3$  мин, для периферического - 8.9 мин. Удельный кажущийся объем распределения равен 0.33 л/кг. Несмотря на двухфазность фармакокинетики, гифларин равномерно распределяется в центральном и периферическом пуле: объем распределения центрального пула составляет 0.16 л/кг, периферического - 0.17 л/кг.

Фармакокинетические константы, характеризующие кинетику выведения, свидетельствуют об очень быстрой плазменной элиминации гиперозида: период полувыведения равен 4.6 мин, константа элиминации —  $0.15 \text{ мин}^{-1}$ , общий клиренс —  $0.02 \text{ л/мин} \cdot \text{кг}$ . Константа элиминации является комплексным параметром, характеризующим собственно элиминацию лекарственного вещества из организма, метаболизм, а также распределение его по тканям. Так как ни почечный клиренс, ни метаболизм не могут осуществляться за такой короткий промежуток времени, большие значения константы элиминации для гиперозида можно объяснить быстрыми одновременными процессами его метаболизма и распределением по тканям [11]. Ранее установлено, что гиперозид способен эффективно взаимодействовать с липидами модельных мембран и тканями сосудов, что в значительной степени влияет на процессы распределения гиперозида по тканям организма. По сродству к липосомам гиперозид превосходит такие флавоноиды как кверцетин и мирицетин [7].

Параметры фармакокинетики, полученные методом последовательного логарифмирования, аналогичны фармакокинетическим параметрам, рассчитанными первым способом, и позволяют получить уравнение зависимости изменения концентрации гиперозида в крови от времени:

$$C(t) = A_1 e^{-0.6t} + A_2 e^{-0.046t}$$

На Рисунке представлена теоретическая кривая, характеризующая зависимость изменения концентрации гиперозида в периферической камере. Видно, что периоду первоначального снижения концентрации гиперозида в центральной камере соответствует

подъем концентрации в периферической в течение 5 мин с момента введения, дальнейшее снижение концентрации препарата в обеих камерах происходит почти параллельно и характеризуется одинаковой скоростью. Такое быстрое перераспределение гиперозида по всем тканям способствует реализации его многочисленных фармакологических свойств, связанных, по-видимому, с влиянием флавоноида на активность ряда ферментативных систем, направленных на регуляцию нарушений метаболизма белка, в результате чего достигается уменьшение или устранение уремической интоксикации организма.

Таким образом, полученные результаты изучения фармакокинетики гиперозида коррелируют с данными литературы о фармакокинетике других флавоноидов (кверцетин, дигидрокверцетин, байкалин) [1, 6, 7, 8].

#### Выводы

При однократном внутривенном введении Гифларина, раствора для инъекций 1 %, фармакокинетика гиперозида характеризуется быстрым падением его уровня в крови, небольшими значениями времени полувыведения и времени удержания в крови, что обусловлено быстрым распределением гиперозида по тканям и одновременным его метаболизмом. Динамика изменения концентрации гиперозида является двухфазной, что характерно для веществ флавоноидной природы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Васильченко Е.А. Фитопрепараты для нефрологии: разработка ГНЦЛС и современные аспекты фармакотерапии заболеваний почек // Фармаком. - 1999. - № 3, 4. - С. 78-86.
2. Шевченко И.В., Алмакаева Л.Г. Разработка и состав инъекционного препарата гипоазотемического действия // Фармаком. - 2001. - № 4. - С. 41-43.
3. Соколова В.Е., Любарцева Л.А. Влияние флавоноидов на некоторые аспекты азотистого обмена при экспериментальной уремии // Вопр. мед. химии. - 1979. - № 4. - С. 379-382.
4. Георгиевский В.П., Оболенцева Г.В. Концепция создания препаратов природного происхождения в Государственном научном центре лекарственных средств // Фармаком. - 1999. - № 3, 4. - С. 27-39.
5. Лекарственные средства. Каталог препаратов, разработанных Государственным научным центром лекарственных средств. - Харьков, 2000. - С. 515.
6. Воскобойникова И.В. Фармакокинетические исследования биологически активных ксантоновых и флавоновых соединений: Автореф. дисс. ... канд. фарм. наук. - М., 1993. - 27 с.
7. Сродство к биомембранам и некоторые особенности фармакокинетики флавоноидов растительного происхождения / Иванов Л.В., Хаджай Я.И., Кошелева Л.П. и др. // Хим.-фармац. журн. - 1992. - № 2. - С. 20-24.

8. Орлова И. Н., Иванов Л.В. Исследование фармакокинетики водорастворимых солей байкалина при разных путях ведения // Фармаком. - 2001. - № 4. - С. 71-76.
9. Dowd L.E. Spectrophotometric analysis of flavonoids // Anal. Chem. - 1959. - Vol. 31. - P. 1164-1169.
10. Пиотровский В.К. Метод статистических моментов и интегральные модельнонезависимые параметры фармакокинетики // Фармакология и токсикология. - 1986. - № 5. - С. 118 - 127.
11. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика. - М.: Медицина, 1980. - 423 с.

*Резюме*

Орлова І.М.

**Вивчення фармакокінетики гіфларину — ін'єкційного препарату гіпоазотемічної дії**

В експериментах на кроликах вивчено фармакокінетику оригінального препарату гіпоазотемічної та діуретичної дії — гіфларину, що містить як діючу речовину флавоноїд гіперозид. Показано, що фармакокінетика гіперозиду характеризується швидким падінням його рівня у крові, невеликими значеннями часу напіввиведення та часом утримування у крові, що зумовлено швидким розподілом гіперозиду по тканинам та одночасним його метаболізмом. Динаміка зміни концент-

рації гіперозиду є двофазовою, що характерно для речовин флавоноїдної природи.

*Summary*

Orlova I.N

**Study of pharmacokinetics of Hyflarin – injection preparation with hypoazotemic effect**

Pharmacokinetics of original preparation with hypoazotemic and diuretic effect — Hyflarin, which contains flavonoid hyperozide as active substance, in experiments in rabbits was studied. It was shown that hyperozide pharmacokinetics is characterized by rapid decrease of hyperozide blood level, little values of excretion half – cycle and retention time in blood, which is determined by hyperozide rapid distribution in tissues and its simultaneous metabolism. The dynamics of hyperozide concentration change has a diphasic character, which is typical for substances of flavonoidic nature.

**Орлова Ирина Николаевна.** Окончила Харьковский государственный университет (1981). Работает в ГП ГНЦЛС (с 1981). Науч. сотр. лаборатории экспериментальной фармакокинетики, биоэквивалентности и токсикокинетики.

## Аналітичний огляд

УДК 577.112.083

Січкач Л.А., Діхтярьов С.І.

Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів»

### Способи виділення та очищення природних інгібіторів протеолітичних ферментів

Наведено стислий огляд літератури, що наявна у наш час, щодо питання виділення та очищення природних інгібіторів протеолітичних ферментів

Загальновідомо, що протеолітичні ферменти (протеази) відіграють суттєву роль у запаленні, канцерогенезі, беруть участь в імунному процесі. І дійсно, пошук інгібіторів протеаз призвів до одержання ряду сполук, які мають імунomodulatory, протизапальну або протипухлинну дії [1].

У даний час такі інгібітори виділені з різних природних джерел — від мікроорганізмів до тварин і рослин. Інгібітори такого походження поводяться як оборотні або псевдонеоборотні інгібітори, стерично запобігаючи доступу субстрату до активного центру ферменту. За хімічною природою вони є білками та пептидами. Розміри білкових інгібіторів коливаються від 50 амінокислотних залишків (наприклад ВРТІ — бичачий панкреатичний інгібітор трипсину) до 400 і більше залишків амінокислот (наприклад  $\alpha_1$ -інгібітор протеїназ).

На наш час існує близько двох десятків лікарських препаратів на основі білкових інгібіторів протеаз переважно тваринного походження [2]. При лікуванні такими препаратами одним із найбільш розповсюджених ускладнень є розвиток алергічних реакцій. Індивідуальний білок, що відповідає структурі інгібітора, має слабкі антигенні властивості, однак ці властивості притаманні гетерогенним за своїм складом зразкам субстанцій інгібітора, що найчастіше використовуються для приготування його лікарських форм.

Усі білки, як сполуки одного класу, мають подібні властивості й існують у вигляді складних комплексів між собою та з іншими речовинами, що присутні у клітинах і позаклітинному просторі. Через це виділення індивідуального білка із природної сировини викликає певні труднощі.

Спроби одержати очищені інгібітори протеаз починалися ще у першій половині ХХ століття. Перші високоочищені інгібітори протеолітичних ферментів були виділені у кристалічному вигляді Нортропом і Кунітцем із підшлункової залози бика та насіння сої відповідно у 1936 і 1945 роках [3]. Але у подальшому спосіб кристалізації не одержав широкого розповсюдження як загальний шлях очищення інгібіторів. У наш час перевага віддається звичайним методам очищення білків, із яких найбільш важливі фракційне осадження (ФО), ультрафільтрація (УФ), гель-фільтрація (ГФ), іонообмінна хроматографія (ІХ) [4]. Вибір методу з останньої групи залежить від природи цільового білка, вмісту та природи домішок, а також концентрації білка у середовищі, значення рН та іонної сили середовища. Так, інгібітор хімотрипсину з насіння *Schizolobium parahyba* був очищений до гомогенного складу фракціонуванням амонію сульфатом, гель-фільтрацією на сефадексі G-100, хроматографією на сиперозі-12 [5]. Інгібітор субтилізину з насіння *Canavalia lineata* одержували за допомогою ультрафільтрації, іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ- та СП-тойсперлі та високоефективної рідинної хроматографії [6].

Фракціонування білкових сумішей здійснюється на основі відмінностей у фізико-хімічних властивостях різних білків (молекулярна маса, заряд, розчинність, хімічна та біохімічна активність). При цьому опірність багатьох природних інгібіторів денатуруючим факторам середовища дозволяє використовувати для їх очищення специфічні методи — нагрівання екстрактів до температури (80-100) °С, створення сильнокислого (2.0-4.0) або сильнолужного (10.0-12.0) значення рН середовища, додавання органічних розчинників. У даних умовах більшість білків денатурує і може бути видалена з екстракту методом фільтрації або центрифугування. Самі інгібітори залишаються істотно незмінними цими процесами. Зокрема, шляхом підкислення соку картоплі до рН 4.0-4.5, додаванням амонію сульфату до 75 % насичення, гель-фільтрацією на сефадексі G-75 і ультрафільтрацією одержували інгібітор трипсину та хімотрипсину з бульб картоплі [7]. Інгібітор протеаз із органів великої рогатої худоби очищали осадженням супутніх білків у лужному середовищі при рН 9.5-11.3, а після видалення осаду доводили значення рН екстракту до 2. Кінцеве очищення цільового продукту проводили на карбоксиметил-силікагелі з додат-

ковим промиванням сорбенту із продуктом розчином, що містить 20-50 % метанолу, етанолу, пропанолу або їх суміші [8].

Загальну схему одержання білкових інгібіторів можна представити таким чином (Рисунок). Схема буде змінюватися в залежності не тільки від природи інгібітора, а й від джерела його одержання. Наприклад, ІХ рідко застосовується для виділення цільового білка із середовища культивування клітин через те, що значення рН середовища (7.2-7.4) непридатне для використання як аніоніта (рН 3.5-6.0), так і катіоніта (рН 7.9-9.0). Середовище необхідно попередньо розбавити буферним розчином із відповідним значенням рН та іонної сили, діалізувати й знесолити шляхом УФ-спектрофотометрії або підходящої хроматографічної процедури. У той же час ІХ широко застосовується на початку очищення екстракту, так як дозволяє зконцентрувати його. На заключних стадіях ефективна ГФ, внаслідок якої видаляються домішки, що присутні

Рисунок

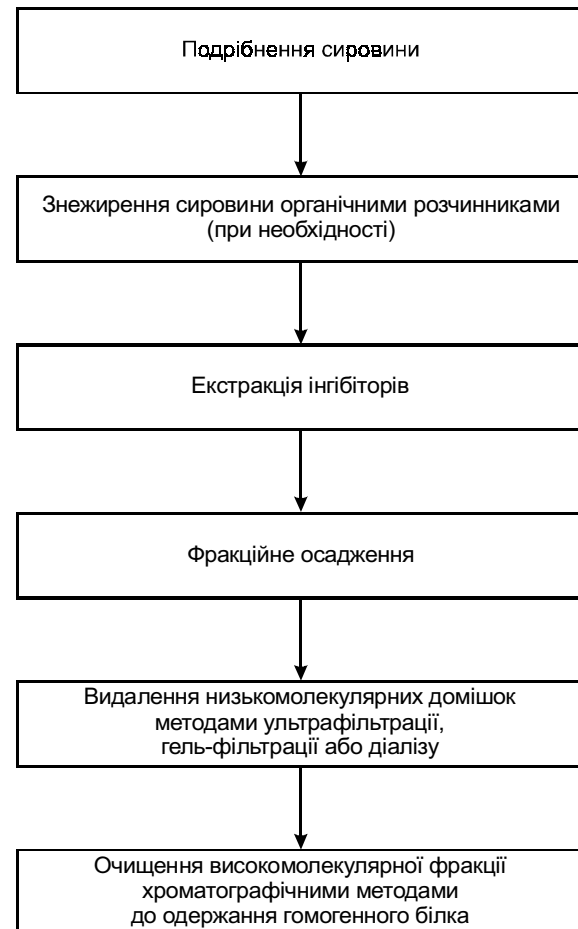


Схема виділення білкових інгібіторів протеолітичних ферментів

у низьких концентраціях. ГФ незамінна для одержання високоочищених білків-інгібіторів, коли з тієї чи іншої причини непридатна афінна хроматографія.

Методи виділення білкових інгібіторів відрізняються між собою в основному умовами екстрагування. Наприклад, японська школа дослідників застосовує для добування інгібіторів Баумана-Бірк із насіння сої етанол та осадження білків ацетоном [9]. Однак цей метод призводить до появи додаткової кількості ізоінгібіторів, тому інші автори пропонують для екстракції інгібіторів трисовий або фосфатний буферні розчини із подальшим осадженням цільових білків амонію сульфатом [10].

Досить часто дослідники використовують підкислення екстрагенту. Описані методи екстракції інгібіторів протеаз 0.1 М розчином кислоти оцтової [11], водними розчинами інших кислот при рН 1-3 [12]. Також одержання інгібітора трипсину проводили з водних екстрактів [13] та сольової фракції білків [14, 15].

Майже всі відомі на наш час інгібітори протеолітичних ферментів із природних джерел були одержані в лабораторних умовах. Складність виділення високоочищених білкових інгібіторів у промисловому масштабі, а тому їх дефіцитність, обмежує їх практичне застосування.

В останні роки для очищення інгібіторів протеаз у промислових умовах застосовується метод афінної хроматографії з використанням біоспецифічних сорбентів. Афінні сорбенти розробляються рядом іноземних фірм. Найбільш часто використовують агарозу та її похідні [8, 16-20]. Серед останніх широко застосовується гель на основі агарози — «Сефароза» (фірма «Pharmacia», Швеція) [4].

Американською фірмою «Bio-Rad» і японською фірмою «Toyosoda» розроблені синтетичні гелі на основі поліакриламідів [21].

Метод афінної хроматографії відрізняється виключною вибірковістю, ефективністю та простотою виконання. Так, запропоновано ефективний спосіб виділення й очищення інгібітора трипсину з насіння кукурудзи за допомогою афінної хроматографії на трипсин-агарозі для застосування в медичній практиці [16]. Із 250 г муки вдається одержувати до 40 мг високоактивного препарату інгібітора з очищенням у 40 разів. Вивчена можливість виділення методом афінної хроматографії інгібітора трипсину з висівків пшениці [18]. Інгібітор очищений у 25-30 разів із

виходом 40 %. Із насіння сої щетинистої одержано інгібітор трипсину практично 100 % чистоти шляхом очищення на біоспецифічному сорбенті [22].

Для одержання інгібіторів протеаз дослідники застосовують також метод імуноафінної хроматографії з використанням моноклональних антитіл [23, 24], а також один із нових способів очищення білків — афінне осадження [25].

На наш час виділено з природної сировини та ідентифіковано більше 100 білкових інгібіторів протеаз. Більша частина з них відома як інгібітори серинових протеаз. Тільки нещодавно було зроблено значний прогрес у вивченні природних інгібіторів цистеїнових протеолітичних ферментів. А наші знання відносно інгібіторів інших двох класів протеаз (аспартатних та металопротеаз) досі дуже обмежені. Проте, в літературі повідомляється, що саме до аспартатних протеаз належить протеаза вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ). Проблема полягає в тому, щоб знайти нетоксичний інгібітор ВІЛ, який би не діяв на власні аспартатні протеази господаря. Попередні дослідження показують, що найбільш перспективними джерелами таких інгібіторів можуть бути рослини та мікроорганізми.

Таким чином, представлений огляд літератури показує, що до розробки технології природних інгібіторів протеаз необхідно застосувати диференційований підхід із підбором джерела одержання, обладнання та методів виділення й очищення цільового продукту.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Библикова М.В., Иваницкая Л.П. Поиск фармакологически активных соединений среди ингибиторов ферментов микробного происхождения // Антибиотики и химиотерапия. — 1991. — Т. 36. - № 5. — 48-51.
2. Маслова Н.Ф., Діхтярьов С.І., Січкара Л.А., Фаст Л.Г. Сучасний стан застосування інгібіторів протеолітичних ферментів у медицині // Ліки. — 2003. - № 1-2. — С. 22-26.
3. Laskowski M., Kato I. Protein inhibitors of proteinases // Ann. Rev. Biochem. — 1980. — Vol. 49. — P. 593-626.
4. Скоупс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. — 358 с.
5. Souza M.T., Kumiko M., Sampaio M.U., Sampaio C.A.M. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor // Phytochemistry. — 1995. — Vol. 39, No. 3. — P. 521-525.
6. Property and amino acid sequence of a subtilisin inhibitor from seeds of beach *Canavalia lineata* / Hideki K., Yasuhiro S., Satoshi F. et al. // Biosci., Biotechnol. and Biochem. — 1994. — Vol. 58, No. 11. — P. 2004-2008.
7. Ревина Т.А., Валуева Т.А., Ермолова Н.В. и др. Выделение и характеристика нового ингибитора трипсина и химотрипсина из клубней картофеля // Биохимия. — 1995. — Т. 60. - Вып. 11. — С. 1844-1851.
8. Пат. 2229888 Россия, МПК<sup>7</sup> А61 К35/12, К38/55. Способ получения основного ингибитора протеаз из орга-

- нов крупного рогатого скота / Акименко З.А., Решетников С.С., Тюнин А.С. (Россия); № 2002124666/15; Заявл. 16.09.2002; Опубл. 10.06.2004. — 4 с.
9. Ларионова Н.И., Гладышева И.П. Растительные ингибиторы протеаз семейства Баумана-Бирк // Новости науки и техники: Сер. Биотехнология. — 1990. — Вып. 8. — С. 20-80.
10. Sessa D.J., Haney J.K., Nelsen T.C. Inactivation of soybean trypsin inhibitors with ascorbic acid plus copper // J. Agr. and Food Chem. — 1990. — Vol. 38, No. 7. — P. 1469-1474.
11. Михайлова А.Г., Евтюкова Н.Г., Чупова Л.А., Румш Л.Д. Ингибитор энтеропептидазы и трипсина из двенадцатиперстной кишки быка // Вопр. мед. химии. — 1999. - № 6. — С. 25-33.
12. Пат. 2088241 Россия, МПК<sup>6</sup> А61 К35/39, К35/42, К38/55. Способ получения основного ингибитора протеаз из легкого и поджелудочной железы крупного рогатого скота / Пак В.Н., Овечкина Л.Г. (Россия); № 94009214/14; Заявл. 18.03.94; Опубл. 27.08.97. — 4 с.
13. Deshpande S.S., Nielsen S.S. In vitro digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: the role of heat-stable protease inhibitors // J. Food Sci. — 1987. — Vol. 52, No. 5. — P. 1330-1334.
14. Wu C., Whitaker J.R. Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*, var. linden) // J. Agr. and Food Chem. — 1990. — Vol. 38, No. 7. — P. 1523-1529.
15. Пат. 2103887 Россия, МПК<sup>6</sup> А23 L1/325. Способ получения основного ингибитора протеолиза / Миленина Н.И., Слуцкая Т.Н., Логачева О.В. и др. (Россия); № 96112278/13; Заявл. 17.06.96; Опубл. 10.02.98. — 2 с.
16. Винниченко А.И., Филоник И.А., Зинченко Н.Г. Препарат ингибитора трипсина из зерна мутантной кукурузы и его медико-биологическое применение // Тез. докл. 3 Регион. совещ. респ. Сред. Азии и Казахстана по хим. реактивам. — Том. 2. — Ташкент, 1990. — С. 33.
17. Дунаевский Я.Е., Павлюкова Е.Б., Белякова Г.А., Белозерский М.А. Анионные ингибиторы трипсина из покоящихся семян гречихи: выделение, специфичность действия и влияние на рост микромицетов // Биохимия. — 1994. — Т. 59. - Вып. 7. — С. 990-996.
18. Жармагамбетова Ж.Х., Жумаханова Г.Д., Аллахвердиев А.М. Выделение ингибитора переваривания из побочных продуктов технологии производства муки // Алма-Атинский филиал Джамбульского технол. ин-та легкой и пищ. пром-сти. — Алма-Ата, 1991. — 12 с. — Деп. в КазНИИНТИ 08.01.91, № 3265-Ка 91 // Аннот. в РЖХ, 10Р 1143, 1991.
19. Пат. 23548 Україна, МКИ<sup>6</sup> А 61 К 35/00. Спосіб одержання інгібітора трипсиноподібних протеаз / В.А. Дівоча (Україна); № 97052520; Заявл. 30.05.97; Опубл. 31.08.98, Бюл. № 4. — 2 с.
20. Song I., Taylor M., Baker K., Bateman R.C. Inhibition of cysteine proteinases by *Carica papaya* cystatin produced in *Escherichia coli* // Gene. — 1995. — Vol. 162, No. 2. — P. 221-224.
21. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М.: Наука, 1985. — 536 с.
22. Сичкар Л.А., Діхтярьов С.І., Сухінін В.М. Получение лекарственной растительной субстанции ингибитора трипсина // Фармаком. — 2002. - № 3. - С. 137-141.
23. Белова Л.А., Оглоблина О.Г., Беккерт Р. Новый метод выделения кислотостабильного ингибитора трипсина из мочи человека // Биохимия. — 1993. — Т. 58, № 8. — С. 1199-1205.
24. Frokiaer H., Horlyck L., Sorensen S., Sorensen H. Immunoaffine chromatography purification and characterisation of pea trypsin inhibitors // J. Sc. Food Agr. — 1994. — Vol. 66, No. 1. — P. 61-69.
25. Галаев И.Ю., Маттиассон Б. Новые методы аффинной очистки белков. Аффинное осаждение // Биохимия. — 1997. — Т. 62. - Вып. 6. — С. 669-676.

## Резюме

Сичкар Л.А., Дихтярев С.И.

**Способы выделения и очистки природных ингибиторов протеолитических ферментов**

Приведен краткий обзор имеющейся в настоящее время литературы по вопросу выделения и очистки природных ингибиторов протеолитических ферментов.

## Summary

Sichkar L.A., Dikhtyarev S.I.

**Methods of isolation and purification of natural inhibitors of proteolytic enzymes**

The brief review of available at present time literature to the matter of isolation and purification of natural inhibitors of proteolytic enzymes was given.

**Сичкар Лілія Анатоліївна.** Закінчила Харківський державний політехнічний університет (1996). В.о. ст. наук. співр. лабораторії хімії та технології біополімерів. К.фарм.н. (2003).

**Діхтярьов Сергій Іванович** (н. 1951). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1973). Працює в ДП ДНЦЛЗ (від 1975). Заст. директора з наукової роботи (1990). Зав. лабораторії хімії та технології біополімерів (1995). Д.фарм.н. (1992). Професор (2002).

## До відома авторів журналу «Фармаком»

Для публікації на сторінках нашого журналу автори повинні дотримуватися таких вимог:

1. Стаття повинна мати такі необхідні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими або практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми і на які спирається автор, виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, яким і присвячується означена стаття; формулювання цілей статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням одержаних наукових результатів; висновки з даного дослідження та перспективи подальших розвідок у даному напрямку.
2. Стаття має бути надрукована на папері формату А4 через 2 інтервали з полями 2.5 см з усіх боків, 28-30 рядків на сторінці, 60-65 знаків у рядку, розмір шрифту 14, шрифт Times New Roman або Arial.
3. Робота подається на українській мові (для авторів, що проживають за межами України – можливо на російській) у 2-х примірниках, підписаних усіма авторами.
4. Прізвище(а) автора(ів) слід зазначити на першій сторінці, далі привести назву організації або установи, де працює(ють) автор(и) та назву статті, також мають бути зазначені рубрики УДК.
5. Матеріали до публікації обов'язково мають включати резюме (російською, українською та англійською мовами), та відомості про кожного з авторів із зазначенням прізвища, ім'я та по батькові, наукового звання (посади) (із зазначенням року), наукового ступеня (із зазначенням року), місця роботи, службового та домашнього телефонів.
6. До статті мають бути прикладені супровідний лист та експертний висновок про можливість публікації у відкритому друці.
7. До статті мають бути прикладені всі використані в роботі таблиці, графіки та ін.; список літератури надається у відповідності до загальноприйнятих правил оформлення.
8. У статті не допускається скорочень слів, крім загальноприйнятих у науковій літературі. Усі вимірювання подаються у системі одиниць СІ. Усі аббревіатури мають бути розшифровані. У числах, що являють собою десяткові дроби, цілі числа від дробової частини слід відокремлювати крапкою.
9. Усі вищезазначені матеріали мають бути надані до редакції також на магнітному носії (дискета, диск).
10. Комп'ютерний набір статті має виконуватися у текстовому редакторі MS Word 97, у разі набору в іншій версії – у форматі RTF. Формули мають бути набрані у редакторі формул, що убудований до MS Word (Microsoft Equation 3.0.).
11. Вимоги до ілюстративного матеріалу:
  - ілюстрації мають бути виконані на професійному рівні, відповідати основному змісту статті та мають бути підписаними;
  - графіки, діаграми та ін. краще будувати у табличному редакторі Excel 97. Якщо даний ілюстративний матеріал створений за допомогою інших програм, зображення слід подавати у векторному форматі WMF. Так як журнал видається у чорно-білому виконанні, графіки мають бути виконані з відповідними відтінками;
  - на графіках мають бути зазначені експериментальні точки;
  - фотографії, файли із растровими зображеннями мають бути високої якості та не мати дефектів (подряпини, плями, погана різкість, муар та ін.). Формати файлів TIFF, BMP;
  - криві, виконані на різних самописцях, мають бути роздруковані на білих аркушах без сітки;
  - структурні хімічні формули обов'язково мають бути набрані в спеціалізованих програмах типу ChemWin та надані у векторному форматі WMF;
  - різні види ілюстративного матеріалу не мають дублювати один одного.
12. Редакція залишає за собою право редагувати статті.
13. Матеріали статті автору не повертаються.
14. При невиконанні зазначених вимог статті розглядатися не будуть.
15. За достовірність інформації в публікаціях відповідальність несуть автори.