

Зміст

До запровадження Державної Фармакопеї України

Котов А.Г.

Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну сировину до Державної Фармакопеї України 5

Фітохімічні дослідження

Куликів А.Ю., Галат М.М., Бойченко О.П.

Оптимізація розділення флавоноїдів із використанням методу міцелярної рідинної хроматографії 20

Ханін В.А., Владимірова І.М., Кисличенко В.С.

Вивчення біологічно активних речовин брокколи методом хромато-мас-спектрометрії..... 29

Попова Н.В., Литвиненко В.І.

Аналіз ефірної олії меліси лікарської 37

Льїна Т.В., Горяча О.В., Ковальова А.М., Андрусенко О.В., Комісаренко А.М.

Амінокислотний склад кореневищ із коренями та трави *Galium verum* L. 41

Затильнікова О.О., Ковальов С.В.

Вивчення амінокислотного та мінерального складу підземних органів *Iris pseudacorus* L. 45

Лобурцова М.С., Гонтова Т.М., Хворост О.П.

Амінокислотний склад сировини та густих екстрактів *Pulmonaria obscura* Dumort. 48**Готові лікарські засоби**

Ткач М.М., Стрельников Л.С., Ткачова О.В., Кабачний Г.І.

Вивчення специфічної активності та гострої токсичності нової лікарської форми з бактеріофагом стафілококовим в умовах *in vitro* та *in vivo* 50

Калюжная О.С., Стрельников Л.С., Стрілець О.П.

Мікробіологічне обґрунтування створення пробіотичного препарату для профілактики та лікування вагінальних дисбіозів..... 55

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості

Бовтенко В.О., Безугла О.П., Ляпунов М.О., Столпер Ю.М.

Валідація методик аналізу препарату «Сальбутамол, інгаляція під тиском, 100 мкг/доза» 60

Степаненко С.В., Чуєшов В.І., Ханін В.А.

Розробка методик кількісного визначення діючих речовин у складі комплексного препарату пульмонологічного призначення..... 72

Технологія лікарських засобів

Ковалевська І.В., Рубан О.А., Чернов А.М.

Визначення параметрів режиму сушіння гранул із рослинними екстрактами в комбінації із синтетичними речовинами 78

-
- Рецензенти: к.б.н. Бомко Т.В.; чл.-кор. НАНУ, д.фарм.н., професор Георгієвський В.П.; д.фарм.н., професор Гудзенко О.П.; д.х.н., професор Гризодуб О.І.; д.фарм.н., професор Діхтярьов С.І.; к.фарм.н. Жемерова К.Г.; д.фарм.н., професор Казарінов М.О.; д.х.н., професор Литвиненко В.І.; к.б.н. Лібіна В.В.; д.б.н., професор Маслова Н.Ф.; к.б.н. Нікітіна Н.С.
 - Випуск підготували: Саматов Р.С., Тихоненко Т.М., Тихоненко Н.І.
 - Рекомендовано до друку Вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів», протокол № 3 від 16.03.09.
 - Підписано до друку 25.03.09. Тираж 500 прим.
-

Сліпченко Г.Д.

Деякі технологічні аспекти розробки твердих лікарських форм на основі шоломниці байкальської 83

Фармакологічні дослідження

Крамаренко О.О.

Порівняльна оцінка фармакологічної дії вітчизняного препарату «Парацетамол, суспензія» і препарату «Панадол Бебі» 87

Мищенко О.Я., Яковлева Л.В., Кошова О.Ю.

Оцінка імунотропної дії нового комбінованого засобу «Поллентар» 91

Демидяк О.Л., Марчишин С.М., Яковлева Л.В., Кошова О.Ю.

Вплив рідких екстрактів різних видів арніки на перебіг гострого ексудативного запалення, індукованого карагеніном 96

Техніко-економічні та маркетингові дослідження

Півень О.П., Андрюкова Л.М.

Сучасний стан і перспективи розвитку ринку офтальмологічних препаратів на прикладі діяльності провідних зарубіжних фармацевтичних компаній 99

Пестун І.В., Мнушко З.М.

Тенденції та особливості рівневого маркетингового управління на фармацевтичному ринку 106

Аналітичний огляд

Літвінова О.В.

Фармакологічна регуляція балансу цитокінів при захворюваннях печінки (огляд) 112

Історія вітчизняної фармації

До 85-річчя від дня народження Конєва Ф.А. 119

До 80-річчя від дня народження Борисова М.І. 121

Содержание

К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины

Котов А.Г.

Исследования по разработке и введению монографий
на лекарственное растительное сырье
в Государственную Фармакопею Украины 5

Фитохимические исследования

Куликов А.Ю., Галат М.Н., Бойченко А.П.

Оптимизация разделения флавоноидов с использованием
метода мицеллярной жидкостной хроматографии 20

Ханин В.А., Владимирова И.Н., Кисличенко В.С.

Изучение биологически активных веществ брокколи
методом хромато-масс-спектрометрии 29

Попова Н.В., Литвиненко В.И.

Анализ эфирного масла мелиссы лекарственной 37

Ильина Т.В., Горячая О.В., Ковалева А.М.,

Андрусенко А.В., Комиссаренко А.Н.

Аминокислотный состав корневищ с корнями
и травы подмаренника настоящего 41

Затыльников О. А., Ковалев С. В.

Изучение аминокислотного и минерального состава
подземных органов *Iris pseudacorus* L. 45

Лобурцова М.С., Гонтовая Т.Н., Хворост О.П.

Аминокислотный состав сырья и густых экстрактов *Pulmonaria obscura* Dumort. 48

Готовые лекарственные средства

Ткач М.Н., Стрельников Л.С., Ткачева О.В., Кабачный Г.И.

Изучение специфической активности и острой токсичности
новой лекарственной формы с бактериофагом стафилококковым
в условиях *in vitro* и *in vivo* 50

Калюжная О.С., Стрельников Л.С., Стрилец О.П.

Микробиологическое обоснование создания пробиотического
препарата для профилактики и лечения вагинальных дисбиозов 55

Стандартизация лекарственных средств и валидаия методик контроля качества

Бовтенко В.А., Е.П. Безуглая Е.П., Ляпунов Н.А., Столпер Ю.М.

Валидация методик анализа препарата «Сальбутамол, ингаляция
под давлением, 100 мкг/доза» 60

Степаненко С.В., Чуешов В.И., Ханин В.А.

Разработка методик количественного определения
действующих веществ в составе комплексного препарата
пульмонологического назначения 72

Технология лекарственных средств

Ковалевская И.В., Рубан Е.А., Чернов А.Н.

Изучение параметров режима сушки гранул с растительными
экстрактами в комбинации с синтетическими веществами 78

Слипченко Г.Д.

Некоторые аспекты разработки твердых лекарственных форм
на основе шлемника байкальского 83

Фармакологические исследования*Крамаренко Е.А.*

Сравнительная оценка фармакологического действия
отечественного препарата «Парацетамол, суспензия»,
и препарата «Панадол Беби»..... 87

Мищенко О.Я., Яковлева Л.В., Кошечкина Е.Ю.

Оценка иммуностимулирующего действия нового
комбинированного средства «Поллентар» 91

Демидьяк О.А., Марчишин С.М., Яковлева Л.В., Кошечкина Е.Ю.

Влияние водных экстрактов разных видов арники
на течение острого экссудативного воспаления,
индуцированного каррагенином..... 96

Технико-экономические и маркетинговые исследования*Пивень Е.П., Андрюкова Л.Н.*

Современное состояние и перспективы развития рынка
офтальмологических препаратов на примере деятельности
ведущих зарубежных фармацевтических компаний 99

Пестун И.В., Мнушко З.Н.

Тенденции и особенности уровневого маркетингового управления
на фармацевтическом рынке..... 106

Аналитический обзор*Литвинова Е.В.*

Фармакологическая регуляция баланса цитокинов
при заболеваниях печени (обзор) 112

История отечественной фармации

К 85-летию со дня рождения Конева Ф.А. 119

К 80-летию со дня рождения Борисова М.И. 121

До запровадження Державної Фармакопеї України

УДК 615.11

Котов А.Г.

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну сировину до Державної Фармакопеї України

Узагальнено дані з розробки та введення 20 монографій на ЛРС до ДФУ 1.2. Показано, що на даному етапі створення нормативної бази для ЛРС в Україні необхідно дотримуватися досвіду ЄФ у частині структури документа, при розробці методик використовувати достовірні й уніфіковані методи контролю якості. Проте, необхідно використовувати і досвід ГФ XI, і враховувати сучасний стан вирощування, збирання, сушіння ЛРС в Україні. Запропоновано алгоритм розробки, що дозволить оцінити необхідний і додатковий об'єми виконуваних робіт для створення монографії на ЛРС, відповідної сучасним вимогам.

Одним із найважливіших джерел для створення лікарських засобів є лікарська рослина сировина (ЛРС). Обов'язковою умовою використання ЛРС є її відповідна якість. Згідно Директиви 75/318/ЕЕС «постійність якості препаратів рослинного походження може бути забезпечена тільки, якщо вихідній сировині дана точна і докладна характеристика...» [1].

Створення нормативних документів на ЛРС дуже кропітка та тривала робота. Вона ґрунтується на багаторічному досвіді дослідження певного виду рослини ботаніками, фармакогностами, фітохіміками. Крім того, необхідною умовою для введення в офіційний вид тієї або іншої рослинної сировини є її доведена фармакологічна активність. Підсумком такої спільної роботи є монографія або загальна стаття у державному документі (Фармакопеї) або документ, що регламентує якість ЛРС певного виробника (аналітичний нормативний документ (АНД)). Такий підхід до всебічної характеристики на ЛРС демонструє ВООЗ (WHO) [2, 3, 4]. Монографії на ЛРС у Фармакопеях усіх країн створювалися і створюються на основі такого досвіду. Зокрема, Європейська Фармакопея (ЄФ) спирається на величезні здобутки у даній області Британської та Німецької Фармакопей [5, 6].

Від 2004 року і в Україні розпочато роботи із введення монографій на ЛРС до Державної Фармакопеї (ДФУ). У роботі [7] дана оцінка рівня АНД на ЛРС, що діють у даний час в Україні; зазначено причини відсутності у ДФУ монографій на ЛРС; обґрунтовано актуальність введення у ДФУ монографій на ЛРС; запропоновано концепцію введення монографій на ЛРС до ДФУ; освітлено проблеми розробки монографій ДФУ на ЛРС. У зв'язку з цим слід зазначити, що у 2007 році EDQM розробило Керівництво, де визначено чіткі вимоги, яких

слід дотримуватися при розробці монографій на ЛРС і препаратів на її основі [8].

Метою даної роботи є дослідження досвіду розробки і введення монографій на ЛРС до ДФУ. Для досягнення поставленої мети було визначено такі завдання: узагальнити результати досліджень і скласти алгоритм проведення експерименту для розробки монографій ДФУ на ЛРС.

Об'єкти дослідження

Відповідно до концепції створення та введення монографій на ЛРС [9], уся лікарська сировина була поділена на такі групи:

- рослини, описані і в ЄФ, і в ГФ XI;
- рослини, описані і в ЄФ, і в ГФ XI, але для яких описано різні морфологічні частини;
- рослини, описані і в ЄФ, і в ГФ XI, але для яких описано різні види;
- рослини, описані в ЄФ і не описані в ГФ XI;
- рослини, описані в ГФ XI і не описані в ЄФ.

Для розробки проектів монографій у Доповнення 2 до ДФУ було обрано об'єкти дослідження, що належать до перших чотирьох груп (Табл. 1). Критерієм оцінки для всіх обраних рослин був рівень використання (високий, середній, низький) для виготовлення лікарських засобів і, відповідно, затребуваність на ринку. Високий рівень — солодки корені, алтеї трава, алтеї корені, гінкго листя, глоду плоди, пасифлора, нагідок квітки, собачої кропиви трава, валеріани корені, глоду листя та квітки, евкаліпта листя, ромашки квітки. Середній рівень — бузини квітки, алтеї листя, липи квітки, гібіскус, деревію трава, вовчуга корені, чистотілу трава, звіробою трава. Низький рівень — бобівника трилистого листя, гвоздика.

На теперішній час вже введено в дію Доповнення 2 до Державної Фармакопеї України 1-го

Таблиця 1

Об'єкти дослідження

ЛРС, описана і в ЄФ, і в ГФ XI	ЛРС, описана і в ЄФ, і в ГФ XI, але для якої описано різні морфологічні частини	ЛРС, описана і в ЄФ, і в ГФ XI, але для якої описано різні види	ЛРС, описана в ЄФ і не описана в ГФ XI
Бобівника трилистого листя Menyanthidis trifoliatae folium	Алтеї трава ^N Althaeae herba	Алтеї корені Althaeae radix	Гінкго листя Ginkgonis folium
Бузини квітки Sambuci flos	Алтеї листя Althaeae folium	Глоду плоди Crataegi fructus	Пасифлора Passiflorae herba
Липи квітки Tiliae flos	Календули квітки Calendulae flos	Собачої кропиви трава Leonure cardiaca herba	Гвоздика Caryophylli flos
Валеріани корені Valerianae radix	Глоду листя і квітки Crataegi folium cum flore	Евкалипта листя Eucalypti folium	Гібіскус Hibisci sabdariffae flos
Деревію трава Millefolii herba		Вовчуга корені Ononidis radix	
Солодки корені Liquiritiae radix		Звіробою трава Hyperici herba	
Чистотілу трава Chelidonii herba			
Ромашки квітки Matricariae flos			

видання, в яке вперше увійшло 20 монографій на лікарську рослинну сировину (ЛРС) [5].

Серед ЛРС, монографії на яку введено до Доповнення 2 до ДФУ, 6 видів — сировина, описана в ЄФ [10, 11, 12] та, яка або не описана в ГФ XI [13], або для якої в ГФ XI наведено інші види: вовчуга корені, гвоздика, гібіскус, гінкго білоба, евкалипта листя та пасифлора. Так наприклад, в ЄФ наведена монографія на корені вовчуга, де описані корені *Ononis spinosa* L., у той час як в ГФ XI описані корені *Ononis arvensis* L. Аналогічна ситуація із листям евкалипта: в ЄФ описано листя *Eucalyptus globules* Labill., в ГФ XI — культивованого дерева *Eucalyptus viminalis* Labill.

Монографії ДФУ на таку ЛРС являють собою, переважно, адаптований переклад монографій ЄФ. У майбутньому, у разі необхідності, можлива розробка монографій саме на ті види зазначеної вище сировини, що описані в ГФ XI (наприклад, національні монографії на корені вовчуга та на листя евкалипта), в яких за основу буде взятий підхід ЄФ з урахуванням національних вимог до стандартизації як сировини, так і препаратів із неї.

Решта монографій, включених до Доповнення 2 до ДФУ, описують ЛРС, наведену в ГФ XI.

Розробка таких монографій стала можливою лише на основі проведення попередніх досліджень. У ході них було науково обґрунтовано і розроблено підходи до побудови проектів мо-

нографій на ЛРС із урахуванням європейських вимог [14].

Порівняльний аналіз показників якості сировини, що регламентуються монографією ЄФ і статтею ГФ XI

ОПИС

Наскільки непростою може бути гармонізація вимог ЄФ із національними вимогами до якості ЛРС, стає очевидним вже на стадії проведення порівняльного аналізу опису ЛРС. Так, було встановлено, що в ЄФ описані тільки два види глоду, їх гібриди і суміші, які також описані в ГФ XI серед 12 видів, дозволених до застосування. Крім того, у розділі «Сторонні домішки» ЄФ не допускає вмісту трьох видів глоду (один із яких також описаний в ГФ XI — *Crataegus pentagyna* Waldst et Kit), що характеризуються наявністю більше 3 кісточок [15].

Та ж сама проблема була виявлена при аналізі опису квіток і листя глоду: в ЄФ описано тільки п'ять видів глоду та їх гібриди, із яких три види також описано в ГФ XI серед 14 видів, дозволених до використання [16]. Крім того, ГФ XI регламентує якість тільки квіток, що значно обмежує використання цього популярного виду сировини.

Аналогічні проблеми було виявлено при порівняльному аналізі опису ще кількох видів ЛРС. Так, в ЄФ описано один вид собачої кропиви — *Leonurus cardiaca* L, а в ГФ XI, крім даного виду,

описано також *Leonurus quinquelobatus* Gilib [17]. В ГФ XI, крім *Hypericum perforatum* L., описано ще один вид звіробою - *Hypericum maculatum* Crantz. (*H. Quadrangulum* L.) [18].

Та ж сама ситуація виявлена і для сировини алтеї корені: в ЄФ регламентується якість очищених або неочищених коренів *Althaea officinalis* L, а в ГФ XI дозволяється використання двох видів сировини - *Althaea officinalis* L. та *Althaea armeniaca* Ten. [19].

Для квіток липи, навпаки, було з'ясовано, що в ГФ XI описано два види сировини - суцвіття *Tilia cordata* Miller, *Tilia platyphyllos* Scop., а в ЄФ - три види сировини — суцвіття *Tilia cordata* Miller, *Tilia platyphyllos* Scop., *Tilia × vulgaris* Heyne. *Tilia × vulgaris* Heyne є спорідненим видом *Tilia cordata* Miller та *Tilia platyphyllos* Scop. [20].

Інша проблема була встановлена для квіток нагідок [21]. Як у ЄФ, так і в ГФ XI описаний один і той же культивованій вид нагідок — *Callendula officinalis* L., проте за ЄФ лікарською сировиною є квітки без квітколожа, а за ГФ XI — квіткові кошики (суцвіття). ЄФ допускає збір квіток махрових форм, ГФ XI дозволяє також використання немахрових форм. Таким чином, ми стикаємося із принципово різними підходами при опису сировини, що призведе не тільки до подорожчання сировини та препаратів на її основі, але і до відповідних численних змін і перегляду діючих АНД на препарати, до складу яких входять квітки нагідок.

Проведений аналіз показав, що, якщо орієнтуватися тільки на вимоги ЄФ, виробники та споживачі позбавляться великої кількості популярної в нашій країні лікарської сировини.

У результаті проведеного аналізу було запропоновано до національних частин монографій «Глоду плоди», «Звіробій», «Собача кропива», «Нагідок квітки», «Алтеї корені» та проекту монографії «Глоду листя та квітки» додатково включити ті види сировини, що описані в ГФ XI.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

У першу чергу, слід відмітити, що ЄФ, у порівнянні з ГФ XI, набагато ширше надає розділ «Ідентифікація». Кожна монографія ЄФ на ЛРС у цьому розділі містить якнайменше три підрозділи: «Макроскопія», «Мікроскопія» та «Тонкошарова хроматографія», а в деяких монографіях ще додатково наведено якісні реакції на характерні біологічно активні сполуки сировини. Лише у деяких статтях ГФ XI ідентифікацію сировини проводять із використанням хроматографічних методів («Кора калини», «Цветки боярышника», «Плоды боярышника» та ін. — у

7 із 88 статей на ЛРС), Більшість статей містять тільки макроскопічні та мікроскопічні ознаки, зрідка додатково наведено якісні реакції.

Таким чином, навіть поверхневий порівняльний аналіз вимог до проведення ідентифікації ЛРС дозволяє виявити очевидну перевагу вимог ЄФ.

Макроскопія (Зовнішні ознаки)

Цілком зрозуміло, що використання додаткових видів сировини за ГФ XI у порівнянні з ЄФ, автоматично призводить до появи змін у розділі «Макроскопія» монографії, що розробляється, а саме додається опис макроскопічних ознак тих видів, що описані в ГФ XI і не описані в ЄФ. Так, наприклад, у монографії «Нагідок квітки» ЄФ дає відомості про язичкові та трубчасті квітки, їх колір, розмір, а в ГФ XI, крім квіток, наведено опис обгортки та квітколожа.

На основі детального порівняльного аналізу макроскопічних ознак різних видів сировини було запропоновано до національних частин монографій «Глоду плоди», «Звіробій», «Собача кропива», «Нагідок квітки», «Алтеї корені» ввести опис макроскопічних ознак тих видів сировини, що додатково описані в ГФ XI.

Окремо вирішувалось питання, пов'язане із розробкою національної частини проекту монографії «Глоду листя та квітки». Це було зумовлене, по-перше, тим що в ГФ XI дозволено до використання додатково 7 видів сировини у порівнянні з ЄФ, а, по-друге, тим що в Україні фармакопейною сировиною є квітки глоду, хоча вітчизняні виробники ЛРС використовують саме квітки та листя глоду. Цілком зрозуміло актуальність розробки національної монографії на даний вид ЛРС, а також те, що керуватися у данному разі вимогами тільки ГФ XI проблематично, оскільки у статті ГФ XI «Цветки боярышника» наведено макроскопічні ознаки тільки квіток і відсутній опис листків. Враховуючи це, був проведений детальний аналіз макроскопічних характеристик усіх видів глоду, що описані в ГФ XI [22].

Порівняльний аналіз морфологічної будови листків, суцвіть і квіток 12 видів роду *Crataegus* L., запропонованих для введення до національної частини монографії ДФУ, показав, що для їх ідентифікації та діагностики важливими є такі макроскопічні ознаки: форма верхівки та основи пластинки листка, характер її опушення, відносна довжина черешка, ступінь опушення осей суцвіть і квітконіжок, форма та відносна довжина чашолистків і кількість стовпчиків маточки. Зазначені вище характеристики були запропоновані для введення до

розділу «Ідентифікація» національної частини проекту монографії ДФУ.

Мікроскопія

Відмітною особливістю ЄФ і ГФ XI при мікроскопічному дослідженні сировини є, у першу чергу, підготування зразка для проведення експерименту. За ЄФ дослідження проводять на здрібненій на порошок сировині, а за ГФ XI - на мікропрепаратах (квіток, листка, трави) або на поперечних зрізах плодів.

Звичайно, що зміни в розділі «Макроскопія», пов'язані із введенням макроскопічних ознак тих видів, що описані в ГФ XI і не описані в ЄФ, призводять до змін у розділі «Мікроскопія». На основі порівняльного аналізу усіх діагностичних мікроскопічних характеристик у двох документах було запропоновано доповнення відносно мікроскопічних характеристик конкретних видів сировини для включення до національної частини монографій «Собача кропива», «Звіробій», «Нагідок квітки», «Глоду плоди» та проекту монографії «Глоду листя та квітки». Для гармонізації вимог щодо проведення мікроскопічного аналізу усі випробування проводяться на здрібненій на порошок сировині.

Тонкошарова хроматографія

Як уже було зазначено вище, в ЄФ дослідження рослинної сировини методом тонкошарової хроматографії є обов'язковим. На хроматограмах випробовуваних розчинів сировини описується хроматографічний профіль виявлених зон по відношенню до зон речовин-свідків. Останні можуть бути тієї самої природи, що і біологічно активні речовини сировини, а можуть бути в якості зовнішнього стандарту. Так, при проведенні ідентифікації коренів валеріани на хроматограмі випробовуваного розчину сировини регламентується положення зон гідроксивалеренової та валеренової кислот по відношенню до зон речовин-свідків — флуоресцеїну та судану червоного G.

При наведенні хроматографічного профілю зони можуть бути ідентифіковані (тобто конкретна зона належить конкретній речовині), а найчастіше, описується їх колір, інтенсивність забарвлення та положення по відношенню до зон речовин-свідків.

Було з'ясовано, що ідентифікацію сировини, що містить фенольні сполуки (флавоноїди, фенолкарбонові кислоти), проводять із використанням стандартних речовин - гіперозиду, рутину, кофейної та хлорогенової кислот (монографії «Глоду плоди», «Нагідок квітки», «Бузини квіт-

ки», «Ліпи квітки», «Звіробій», проект монографії «Глоду листя та квітки»). Таким чином, ЄФ, по можливості, використовує уніфіковані методики стандартизації сировини, що містить близькі біологічно активні сполуки.

Слід відмітити також, що в ЄФ біологічно активні сполуки, що ідентифікуються у сировині, можуть співпадати, а можуть і не співпадати з тими, що кількісно регламентуються. Так, для трави собачої кропиви при проведенні ідентифікації методом тонкошарової хроматографії регламентується положення зон ірідоїдів по відношенню до зон каталполу та нафтолового жовтого, а кількісно оцінюється вміст флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид. У проекті монографії «Ромашки квітки» в розділі «Ідентифікація» наведено хроматографічний профіль компонентів ефірної олії (хамазулен, ен-ін-дициклоефір, борнілацетат, (α -бісабол), а кількісно визначається як вміст ефірної олії, так і вміст апігенін-7-глюкозиду.

ВИПРОБУВАННЯ НА ЧИСТОТУ

Сторонні домішки

Навіть на стадії проведення порівняльного аналізу регламентацій вмісту сторонніх домішок у сировині цілком зрозумілим стає, наскільки відрізняються національні вимоги до якості ЛРС у порівнянні з вимогами ЄФ.

Насамперед, треба відмітити, що ЄФ у статті 2.8.2 «Сторонні домішки в лікарській рослинній сировині» не допускає у сировині вмісту цвілі, комах і домішок тваринного походження. Кількість сторонніх домішок не має перевищувати 2 %, якщо немає інших зазначень в окремій статті. Під сторонніми мають на увазі такі домішки:

- сторонні органи рослини (органи цільової рослини, що не є лікарськими);
- сторонні частки: домішки рослинного або мінерального походження.

В ГФ XI [23] у статті «Методи аналізу лікарського рослинного сировини» до домішок відносять:

- частини сировини, що втратили нормальне забарвлення (побурілі, почорнілі, що вицвіли та ін);
- інші частини рослини, не відповідні опису зовнішніх ознак сировини;
- органічні домішки (частини інших неотруйних рослин);
- мінеральні домішки (земля, пісок, каміння).

Крім цього, окремо в ГФ XI проводиться визначення ступеня зараженості ЛРС коморними шкідниками.

У ДФУ [24] до статті 2.8.2 введено національну частину, в якій крім домішок, дозволених ЄФ, допускається, зокрема, наявність у сировині частин рослини, що втратили нормальне забарвлення (побурілі, почорнілі та ін.)

У Табл. 2 наведено порівняльні вимоги до вмісту сторонніх домішок в аналізованих видах сировини відповідно до ЄФ і ГФ XI.

Як видно із Табл. 2, чітко вираженої тенденції (тобто тільки більше або тільки менше) у регламентації вмісту домішок у двох документах не спостерігається.

Для деяких видів сировини, насамперед для квіток, ЄФ регламентує значно менший вміст сторонніх домішок, ніж ГФ XI: наприклад, для квіток липи, нагідок і ромашки різниця складає від 4 до 9 разів менше.

Для деяких видів трави (наприклад, звіробою трава, собачої кропиви трава) різниця у регламентації вмісту сторонніх домішок зумовлена, у першу чергу, тим, що ГФ XI додатково регламентує вміст стебел (для собачої кропиви – не більше 46 %, для звіробою – не більше 50 %).

Подібна регламентація вмісту стебел у сировині потребує окремої оцінки.

У фармацевтичній практиці травою називають висушені надземні частини трав'янистих рослин, що зібрані під час цвітіння, іноді під час бутонізації. Дана сировина складається із суміші стебел, листків, квітів, іноді бутонів та незрілих плодів [25]. Таким чином, стебла є складовою частиною сировини трави, їх опис наведено в розділі «Макроскопія». Але, не дивлячись на це, ГФ XI вважає доречним для забезпечення якості сировини регламентувати граничний вміст стебел у траві.

Є також сировина, для якої ГФ XI, навпаки, регламентує менший вміст домішок у порівнянні з ЄФ: наприклад для чистотілу трави ЄФ допускає не більше 10 % сторонніх домішок, а ГФ XI сумарно – не більше 2.5 %, для деревію трави – ЄФ допускає не більше 7 % сторонніх домішок, а ГФ XI сумарно – не більше 2.5 %.

Таким чином, питання про регламентацію вмісту сторонніх домішок у ЛРС доречно вирішувати для кожного конкретного виду сировини окремо з урахуванням результатів аналізу сировини, що використовується в Україні, за даним показником, а також враховуючи специфіку вирощування, збирання, методів сушіння, зберігання тощо. Однак, вміст сторонніх домішок у ЛРС не має перевищувати нормування ГФ XI.

Втрата в масі при висушуванні

Відмінність вимог ЄФ і ГФ XI для даного показника якості ЛРС зумовлена умовами прове-

дення випробування. У монографіях ЄФ втрату в масі при висушуванні ЛРС визначають, висушуючи наважку сировини при температурі (100-105) °С протягом регламентованого (2 год) часу. В ГФ XI для сировини регламентують показник «Вологість», що визначають, висушуючи наважку сировини до постійної маси. Звідси і більша регламентація в ГФ XI у порівнянні з ЄФ.

Щоб усунути розбіжності, до національної частини монографій ДФУ на ЛРС запропоновано показник «Втрата в масі при висушуванні», де не зазначено час висушування, це означає, що наважку сировини висушують до постійної маси. Регламентація надана за ГФ XI.

Загальна зола

Деякі відмінності у регламентації загальної золи в ЄФ та ГФ XI для різних видів ЛРС наявні, але вони не є принциповими, тому при введенні цього показника до монографії ДФУ запропоновано враховувати як вимоги ЄФ, так і якість вітчизняної ЛРС.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

При порівнянні вимог щодо кількісного визначення біологічно активних речовин (БАР) у рослинній сировині користувалися такими критеріями: відповідність вимогам ДФУ, використання сучасних методів аналізу.

У Табл. 3 наведено вимоги щодо методів визначення та регламентації кількісного вмісту БАР у проаналізованих видах ЛРС відповідно до ЄФ та ГФ XI.

Узагальнюючи дані, наведені в Табл. 3, слід відзначити наступне: ЄФ набагато детальніше підходить до оцінки кількісного вмісту БАР сировини, ніж ГФ XI. Переважна більшість монографій ЄФ на ЛРС містить методики кількісного визначення найбільш характерних для конкретної сировини БАР, у деяких монографіях наведено кілька методик. Лише три монографії із досліджених («Алтеї корені», «Липи квітки» та «Бобівника трилистого листа») не містять методик кількісного визначення, але у двох із них містяться показники, що відповідають за кількісний вміст БАР сировини. Для коренів алтеї – це показник набухання, що дозволяє контролювати вміст сахаридів і слизей, для бобівника трилистого листа – це показник гіркоти, що відповідає за кількісний вміст гірких сполук сировини (іридоїдних глікозидів). Методики кількісного визначення ЄФ є специфічними, виконуються із використанням сучасних методів, таких як рідинна хроматографія, спектрофотометрія.

Таблиця 2

Вміст сторонніх домішок у досліджуваних видах сировини

ЛРС	Вимоги ЄФ	Вимоги ГФ ХІ
Бузини чорної квітки	Фрагментів крупних квітконіжок та інших сторонніх домішок - не більше 8 %. Квіток, що змінили колір, побурілих - не більше 15 %.	Інших частин рослини (квітконіжок, віточок, суцвіть і листків) — не більше 10 %. Квіток побурілих — не більше 8 %. Органічної домішки - не більше 1 %. Мінеральної домішки — не більше 1 %.
Алтеї корені	Побурілої, зіпсованої сировини - не більше 2 %.	Дерев'янистих коренів - не більше 3 %. Органічної домішки - не більше 0.5 %. Мінеральної домішки — не більше 0.5 %.
Глоду плоди	Сторонніх домішок - не більше 2 %. Зіпсованих несправжніх плодів - не більше 5 %. Сировина не має містити плодів інших видів <i>Crataegus</i> (<i>C. nigra</i> Waldist. et Kit., <i>C. pentagyna</i> Waldist. et Kit. ex Willd. S і <i>C. azarolus</i> L.), що мають більше трьох кісточок.	Підгорілих плодів - не більше 2 %. Недозрілих плодів (бурувато-зелених) - не більше 1 %. Плодів, пошкоджених шкідниками, дроблених плодів, окремих кісточок, гілочок, плодоніжок, у тому числі відділених при аналізі - не більше 5 %. Органічної домішки - не більше 1 %. Мінеральної домішки - не більше 0.5 %.
Глоду листя та квітки	Здерев'янілих гілочок діаметром більше 2.5 мм - не більше 8 %. Інших сторонніх домішок - не більше 2 %.	Інших частин глоду (віточок, листа) - не більше 6 %. Органічної домішки - не більше 0.5 %. Мінеральної домішки - не більше 0.5 %.
Звіробою трава	Стебел діаметром більше 5 мм - не більше 3 %. Інших сторонніх домішок - не більше 2 %.	Стебел, у тому числі відділених при аналізі — не більше 50 %. Органічної домішки - не більше 1 %. Мінеральної домішки - не більше 1 %.
Нагідок квітки	Приквітків - не більше 5 %. Інших сторонніх домішок - не більше 2 %.	Залишків квітконосів, у тому числі відділених при аналізі - не більше 6 %. Кошиків із несправжньоаязичковими та трубчастими квітками, що повністю обсіпалися (квітколоже з обгортками) - не більше 20 %. Побурілих кошиків - не більше 3 %. Інших частин рослини (шматочків стебел і листків) - не більше 3 %. Органічної домішки - не більше 0.5 %. Мінеральної домішки - не більше 0.5 %.
Липи квітки	Сторонніх домішок - не більше 2 %. Сировина не має містити суцвіть із приквітком, що має на нижній поверхні 5-8 променеві зірчасті волоски, і квіток, що мають явний подвійний віночок завдяки перетворенню п'яти тичинок у пелюсткоподібні стамінодії, із маточкою, що нелопатева, а також незубчаста. 6-членні квітки мають траплятися тільки зрідка (<i>Tilia americana</i> L., <i>Tilia tomentosa</i> Moench).	Побурілих і потемнілих частин суцвіть - не більше 4 %. інших органів липи (листіків і пагонів) - не більше 1 %. суцвіть, що повністю відцвіли, із плодами - не більше 2 %. Осіпу окремих квіток або суцвіть без приквітків — не більше 15 %. Органічної домішки — не більше 0.3 %. Мінеральної домішки — не більше 0.1 %.
Собачої кропиви трава	Коричневих або жовтих листків - не більше 2 %. Інших сторонніх домішок - не більше 2 %.	Почорнілих, побурілих і пожовтілих частин рослини - не більше 7 %. стебел, у тому числі відділених при аналізі - не більше 46 %. Органічної домішки - не більше 3 %. Мінеральної домішки - не більше 1 %.
Ромашки квітки	Сторонніх домішок - не більше 2 %.	Листків, стебел і кошиків із залишками квітконосів довше 3 см - не більше 9 %. Побурілих кошиків - не більше 5 %. Органічної домішки - не більше 3 %. Мінеральної домішки - не більше 0.5 %.

ЛРС	Вимоги ЄФ	Вимоги ГФ ХІ
Солодки корені	Сторонніх домішок – не більше 2 %.	<i>Вимоги ГФ Х</i> Сторонніх органів рослини - не більше 4.0 %. Органічної та мінеральної домішки - не більше 2 %.
Деревію трава	Стебел діаметром більше 3 мм - не більше 5 %. Інших сторонніх домішок - не більше 2 %.	Почорнілих, побурілих частин рослини - не більше 1 %. Органічної домішки - не більше 0.5 %. Мінеральної домішки - не більше 1 %.
Чистотілу трава	Сторонніх домішок - не більше 10 %.	Побурілих та потемнілих частин рослини - не більше 1 %. Органічної домішки - не більше 1 %. Мінеральної домішки - не більше 0.5 %.
Бобівника трилистого листя	Сторонніх домішок – не більше 2 %.	Почорнілих, побурілих і пожовтілих листків - не більше 5 %. Листа з черешками завдовжки 3 см – не більше 8 %. Окремих черешків - не більше 3 %. Органічної домішки - не більше 1 %. Мінеральної домішки - не більше 0.5 %.
Валеріани корені	Основ стебел - не більше 5 %. Інших сторонніх домішок - не більше 2 %.	Інших частин рослини (залишків стебел та листків, у тому числі відокремлених при аналізі), а також старих відмерлих кореневищ – не більше 5 %. Органічної домішки - не більше 2 %. Мінеральної домішки – не більше 3 %.

У ГФ ХІ для стандартизації сировини часто використовуються неспецифічні методи кількісної оцінки БАР (наприклад, тільки вміст екстрактивних речовин), або оцінюється вміст речовин, що не зумовлюють фармакологічну дію сировини (наприклад, у статті на бобівник). При детальному вивченні методик ГФ ХІ нерідко зустрічаються недоліки та похибки, що не дозволяють однозначно відтворювати ці методики (наприклад, методика кількісного вмісту флавоноїдів у плодах глоду, методика кількісного визначення суми флавоноїдів у траві звіробою тощо).

Різними також є підходи ЄФ та ГФ ХІ до того, які БАР кількісно оцінювати у тій чи іншій ЛРС. Так, у траві звіробою ЄФ кількісно оцінює вміст гіперіцинів, а в ГФ ХІ – вміст флавоноїдів, у плодах глоду в монографії ЄФ наведено методику кількісного визначення проціанідинів, а у статті ГФ ХІ – методику кількісного визначення суми флавоноїдів. У зв'язку із цим при розробці національних вимог щодо кількісної регламентації БАР у сировині важливим є питання, яким саме чином стандартизовані вітчизняні препарати із даного виду ЛРС.

Слід також відмітити, що ЄФ для близьких класів БАР використовує уніфіковані методи їх кількісного контролю у різних видах ЛРС, і даний підхід ми вважаємо одним із основних при розробці фармакопейних монографій.

Так, в ЄФ для визначення флавоноїдів у ЛРС використовують дві спектрофотометрич-

ні методики. Перша із них заснована на реакції комплексоутворення виділених у результаті кислотного гідролізу й екстракції етилацетатом продуктів гідролізу із алюмінію хлоридом у середовищі метанол – етилацетат - кислота оцтова та розрахунком вмісту флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид. Ця методика ЄФ використовується для кількісного визначення флавоноїдів у монографіях «Нагідок квітки», «Бузини квітки», «Берези листя», «Собача кропива» тощо. Інша методика ЄФ заснована на спектрофотометричному визначенні глікозидів флавоноїдів після реакції з комплексом кислота борна – кислота щавелева у середовищі кислота мурашина – кислота оцтова та розрахунком вмісту флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид (монографія «Глоду листя та квітки»), або на вітексин (монографія «Пасифлора»).

Таким чином, по-перше, очевидним є перевага вимог ЄФ щодо кількісного визначення БАР у ЛРС у порівнянні з вимогами ГФ ХІ, по-друге - у разі необхідності розробки національних вимог до кількісного визначення БАР очевидним є необхідність розробки уніфікованих сучасних методик, що дозволяли би використовувати єдині підходи до стандартизації ЛРС у монографіях ДФУ.

Дослідження вітчизняної сировини на відповідність вимогам ЄФ і ГФ ХІ

Наступним етапом розробки монографій стало дослідження сировини, що використову-

ється в Україні, на відповідність нормативним документам — ЄФ та ГФ XI. При цьому в якості основних критеріїв, що вивчалися, були такі:

- оцінка можливості відтворення методик;
- наявність реактивів, стандартів в Україні, можливість їх закупівлі за кордоном і доцільність їх використання;
- відповідність досліджуваної сировини регламентації ЄФ та ГФ XI;
- оцінка необхідності розробки національної частини.

Плоди глоду. Було проаналізовано 12 серій сировини. Проведені дослідження показали, що методики ЄФ є відтворюваними, речовини-свідки (кислота хлорогенова, кислота кофейна, гіперозид і рутин), що використовуються при ідентифікації сировини методом ТШХ, так само як і реактиви, є доступними. За основними показниками якості вітчизняна ЛРС відповідала вимогам ЄФ, а вміст проціанідинів залежав від якості сировини та його виду. Проведений аналіз підтвердив попередній висновок про необхідність введення національних вимог щодо опису додаткових видів сировини, макроскопічних і мікроскопічних ознак і регламентації розділу «Сторонні домішки», які б урахували якість сировини, що використовується в Україні.

Враховуючи різний підхід ЄФ та ГФ XI до стандартизації сировини за кількісним вмістом БАР, було зроблено висновок, що при введенні монографії на плоди глоду до ДФУ проблематично керуватися тільки вимогами ЄФ, бо не всі описані в ГФ XI види глоду відповідають вимогам ЄФ за кількісним вмістом проціанідинів. Крім того, якщо за аналогією із плодами глоду, препарати із цієї сировини (наприклад настойки) стандартизувати за вмістом проціанідинів, більшість вітчизняних настоек не будуть відповідати регламентованим вимогам протягом встановленого терміну придатності. У зв'язку із цим, було розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення суми флавоноїдів у сировині, що є уніфікованою та дозволяє використовувати єдині підходи до стандартизації як сировини, так і препаратів із неї [26].

Квітки липи. Було проаналізовано 7 серій сировини. Проведені дослідження показали, що методики ЄФ відтворювані, речовини-свідки (кислота кофейна, гіперозид і рутин) та реактиви є доступними. Проаналізована сировина відповідає вимогам ЄФ за всіма показниками якості [20]. Співпрацюючи із вітчизняними виробниками ЛРС, були проведені додаткові дослідження щодо якості квіток липи за показником «Сторонні домішки», що показали необхідність

введення національних вимог до регламентації сторонніх домішок у сировині з урахуванням якості вітчизняної ЛРС.

Квітки бузини. Було проаналізовано 11 серій сировини. Проведені дослідження показали, що методики ЄФ відтворювані, речовини-свідки (кислота хлорогенова, кислота кофейна, гіперозид і рутин) і реактиви є доступними. Проаналізована сировина відповідає вимогам ЄФ майже за всіма показниками якості [27]. Як і для квіток липи, було введено національні вимоги щодо регламентації сторонніх домішок у сировині. Крім того, враховуючи більший вміст сторонніх домішок у вітчизняній сировині у порівнянні з регламентованим ЄФ вмістом, було зроблено висновок щодо зменшення регламентації вмісту суми флавоноїдів у сировині.

Квітки нагілок. Було проаналізовано 7 серій сировини. Проведені дослідження показали, що методики ЄФ відтворювані, речовини-свідки (кислота хлорогенова, кислота кофейна і рутин) і реактиви є доступними. У зв'язку з тим, що досліджувані зразки сировини були квітковими кошиками, що не описані ЄФ, вони не задовольняли вимогам ЄФ за описом і макроскопічними характеристиками, а також за вимогами розділу «Сторонні домішки» через наявність приквіткових вище регламентованої норми. Проведений аналіз підтвердив попередній висновок про необхідність введення національних вимог щодо опису, макроскопічних ознак, мікроскопічних ознак сировини та регламентації розділу «Сторонні домішки», що урахували би якість вітчизняної сировини [21].

Трава чистотілу. Було проаналізовано 13 серій сировини. Проведений порівняльний аналіз показників якості трави чистотілу показав, що практично за всіма показниками вітчизняна сировина відповідає вимогам монографії ЄФ. Майже всі методики ЄФ відтворювані, речовини-свідки (папаверину гідрохлорид і метиловий червоний) і реактиви є доступними. Але при проведенні ідентифікації сировини методом ТШХ жоден із аналізованих зразків трави не відповідав вимогам ЄФ. Для з'ясування причини було проведено додаткові дослідження, що показали невідповідність хроматографічного профілю та регламентації хроматографічних зон у різних нормативних документах (різних виданнях ЄФ, DAB). Таким чином, був зроблений висновок про необхідність введення національних вимог щодо зазначеного показника якості, які б дозволили проводити ідентифікацію методом ТШХ з урахуванням якості вітчизняної сировини [28].

Трава собачої кропиви. Було проаналізовано 13 серій сировини. З'ясоване наступне: при

проведенні ідентифікації сировини методом ТШХ встановлено, що більшість проаналізованих серій сировини не відповідали вимогам ЄФ за хроматографічним профілем. Крім того, у монографії ЄФ зони ірідодів описують відносно зони каталполу, використання якого в якості речовини-свідка не виправдано у зв'язку з його обмеженою доступністю. Причиною невідповідності за показником «Ідентифікація» (при одночасній відповідності за кількісним вмістом флавоноїдів) виявилася та обставина, що, на відміну від ЄФ, в Україні крім *Leonurus cardiaca* L., дозволено до використання *Leonurus quinquelobatus* Gilib. Було підтверджено попередній висновок, що при введенні до ДФУ монографії на траву собачої кропиви в національній частині необхідно вказувати на можливість використання цього виду сировини, а також навести його макроскопічні та мікроскопічні характеристики.

Було проведено дослідження із розробки методики ідентифікації БАР (флавоноїдних та супутніх сполук) сировини з використанням доступних речовин-свідків. Так як трава собачої кропиви стандартизується за кількісним вмістом флавоноїдів, даний підхід є виправданим. Було розроблено методику ідентифікації БАР сировини з використанням гіперозиду та рутину, яка дозволила проводити ідентифікацію усіх видів сировини, що використовуються в Україні. Крім того, на підставі якісного та кількісного аналізу препаратів із даного виду сировини (настойок) за складом було показано можливість стандартизації даної сировини та препаратів із неї за єдиними методиками [17].

Корені солодки. Було проаналізовано 7 серій сировини. Проведені дослідження показали, що методики ЄФ є відтворюваними, речовини-свідки (гліциретинова кислота та моноамонійна сіль гліциризинової кислоти), що використовуються при проведенні ідентифікації сировини методом ТШХ та кількісного визначення методом ВЕРХ, так само як і реактиви є доступними. На підставі аналізу різних серій сировини, екстрактів коренів солодки, а також сиропів кореня солодки було показано, що використання ЄФ методики кількісного визначення гліциризинової кислоти дозволяє запровадити єдині підходи до стандартизації як самої сировини, так і препаратів із неї [29].

Корені валеріани. Було проаналізовано 10 серій сировини. З'ясовано, що методики ЄФ є відтворюваними, речовини-свідки (флуоресцеїн та судан червоний G — для ідентифікації, дантрон — для кількісного визначення) і реактиви є доступними. На підставі одержаних

результатів та літературних даних, що свідчать про більш низький вміст ефірної олії у валеріани коренях, зібраних на території України, у порівнянні із сировиною інших країн Європи, запропоновано до національної частини монографії «Валеріани корені» ввести національні вимоги щодо кількісного вмісту як ефірної олії, так і сесквітерпенових кислот, що враховують якість вітчизняної ЛРС.

Також враховуючи те, що при закупівлі вітчизняними фармацевтичними підприємствами даного виду сировини вміст екстрактивних речовин є одним із найбільш важливих показників якості, запропоновано до національної частини ввести методику визначення екстрактивних речовин із регламентацією, наведеною в ГФ XI [30].

Співпрацюючи із вітчизняними виробниками ЛРС, були проведені додаткові дослідження щодо якості коренів валеріани за показником «Сторонні домішки», що показали необхідність введення національних вимог до регламентації сторонніх домішок, які б урахували якість вітчизняної ЛРС.

Трава звіробою. Було проаналізовано 10 серій сировини. З'ясовано, що методики ЄФ є відтворюваними, речовини-свідки (рутин і гіперозид) і реактиви є доступними.

Проведений аналіз підтвердив попередній висновок про необхідність введення національних вимог щодо опису додаткового виду сировини *Hypericum maculatum* Crantz (*H. Quadrangulum* L.), що використовується в Україні, а також його макроскопічних та мікроскопічних характеристик.

Усі проаналізовані зразки сировини задовольняли вимогам ЄФ щодо якісного та кількісного вмісту гіперіцинів. Але, враховуючи те, що у всіх вітчизняних нормативних документах препарати звіробою стандартизують за кількісним вмістом флавоноїдів, було розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення суми флавоноїдів у сировині, що є уніфікованою та дозволяє використовувати єдині підходи до стандартизації як сировини, так і препаратів із неї [18].

Трава деревію. Було проаналізовано 10 серій сировини. З'ясовано, що методики ЄФ є відтворюваними, речовини-свідки (гвайазулен, цинеол) та реактиви є доступними.

У ході проведених досліджень було отримано незадовільні результати при проведенні тесту «Ідентифікація» методом ТШХ та якісної реакції. Враховуючи знайдені невідповідності у самій методиці, а також якість сировини (завищений вміст проазуленів у порівнянні з

Таблиця 3

Методи визначення та регламентація кількісного вмісту БАР у досліджуваних видах ЛРС

ЛРС	Вимоги ЄФ	Вимоги ГФ XI
Бузини квітки	Метод СФ. Суми флавоноїдів, у перерахунку на ізокверцитрозид, — не менше 0.8 %.	—
Алтеї корені	Показник набухання — не менше 10.	—
Глоду плоди	Метод СФ. Прочианідинів, у перерахунку на ціанідину хлорид, — не менше 1.0 %	Метод: колоночна хроматографія + СФ. Суми флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, — не менше 0.06 %.
Глоду листя та квітки	Метод СФ. Суми флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, — не менше 1.5 %.	Метод: ТШХ + СФ. Вміст гіперозиду — не менше 0.5 % .
Звіробою трава	Метод СФ. Суми гіперидинів, у перерахунку на гіперидин, — не менше 0.08 %.	Метод СФ. Суми флавоноїдів, у перерахунку на рутин, — не менше 1.5 %.
Нагідок квітки	Метод СФ. Суми флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, — не менше 0.4 %.	Екстрактивних речовин, що витягаються 70 % спиртом, — не менше 35 %.
Липи квітки	—	—
Собачої кропиви трава	Метод СФ. Суми флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид — не менше 0.2 %	Екстрактивних речовин, що витягаються 70 % спиртом — не менше 15 %.
Ромашки квітки	Ефірної олії синього кольору — не менше 4 мл/кг. Метод ВЕРХ. Апігенін 7-глюкозиду — не менше 0.25 %.	Ефірної олії — не менше 0.3 %.
Солодки корені	Метод ВЕРХ. Гліциризинової кислоти — не менше 4.0 %.	ГФ X. Метод СФ. Гліциризинової кислоти — не менше 6.0 %.
Деревію трава	Ефірної олії — не менше 2 мл/кг. Метод СФ. Проазуленів, у перерахунку на хамазулен, - не менше 0.02 %.	Ефірної олії: не менше 0.1 %.
Чистотілу трава	Метод СФ. Суми алкалоїдів, у перерахунку на хелідонін, — не менше 0.6 %.	Титрування. Суми алкалоїдів, у перерахунку на хелідонін, — не менше 0.2 %.
Бобівника трилистого листя	Показник гіркоти — не менше 3000.	Метод ФЕК. Суми флавонолів, у перерахунку на рутин, — не менше 1 %.
Валеріани корені	Ефірної олії - не менше 5 мл/кг (ціла сировина), не менше 3 мл/кг (різана сировина). Метод ВЕРХ. Суми сесквітерпенових кислот, у перерахунку на валеренову кислоту, — не менше 0.17 %.	Екстрактивних речовин, що витягаються 70 % спиртом, — не менше 25 %.

регламентацією ЄФ) було запропоновано до національної частини ввести зміни до розділу «Ідентифікація», а саме - у трактування кольору розчину при проведенні якісної реакції, та у приготування випробовуваного розчину в умовах ТШХ методики, що дозволили врахувати якість вітчизняної сировини [31].

Також враховуючи те, що у деяких вітчизняних нормативних документах препарати трави деревію стандартизують за кількісним вмістом поліфенолів, було розроблено та валідовано спектрофотометричну методику кількісного визначення суми поліфенолів у перерахунку на пірогалол, що є уніфікованою та дозволяє використовувати єдині підходи до стандартизації як сировини, так і препаратів із неї.

Корені алтеї. Було проаналізовано 7 серій сировини. Проведені дослідження показали, що методики ЄФ є відтворюваними, реактиви є доступними, за основними показниками якості вітчизняна ЛРС відповідала вимогам ЄФ. Проведений аналіз підтвердив попередній висновок про необхідність введення національних вимог щодо опису додаткового виду сировини, що використовується в Україні, а саме - *Althaea armeniaca* Ten., порівняльних макроскопічних ознак двох видів сировини (*Althaea officinalis* L. та *Althaea armeniaca* Ten.) та регламентації розділу «Сторонні домішки», які б урахували якість всієї сировини, що використовується в Україні. Крім того, враховуючи розбіжність у регламентованому описі коренів *Althaea officinalis* L.

Таблиця 4

Структура деяких розроблених проектів монографій і монографій для Доповнення 2 до ДФУ

ЛРС	Європейська частина	Національна частина
Алтеї корені	Авторизований переклад монографії ЄФ «Marshmallow root»	Дозвіл на використання очищених коренів <i>Althaea officinalis</i> L. Та <i>Althaea armeniaca</i> Ten. Зміни в розділі «Ідентифікація. А». Зміни в розділах «Сторонні домішки», «Втрата в масі при висушуванні». Кількісне визначення (вміст полісахаридів).
Бобівника трилистого листя	Авторизований переклад монографії ЄФ «Vogbean leaf»	Зміни в розділі «Ідентифікація. С».
Бузини квітки	Авторизований переклад монографії ЄФ «Elder flower»	Зміни в розділах «Сторонні домішки», «Втрата в масі при висушуванні». Зміни у регламентації вмісту флавоноїдів.
Валеріани корені	Авторизований переклад монографії ЄФ «Valerianae root»	Зміни у регламентації вмісту ефірної олії та сесквитерпенових кислот. Зміни в розділах «Сторонні домішки», «Втрата в масі при висушуванні», «Загальна зола». Методика визначення екстрактивних речовин.
Глоду плоди	Авторизований переклад монографії ЄФ «Hawthorn berries»	Дозвіл на використання несправжніх плодів <i>Crataegus monogyna</i> Jacq. (Lindm.) або <i>Crataegus laevigata</i> (Poir.) D.C. (синонім: <i>Crataegus oxyacantha</i> L.), <i>C. Sanguinea</i> Pall., <i>C. korolkowii</i> L. Henry; <i>C. chlorocarpa</i> Lenne et C. Koch; <i>C. dahurica</i> Koehne ex Schneid.; <i>C. alemanniensis</i> Cin.; <i>C. Pentagyna</i> Waldst et Kit., <i>C. orientobaltica</i> Cin.; <i>C. curvisepala</i> Lindm.; <i>C. × curonica</i> Cin.; <i>C. × dunensis</i> Cin. або їх гібридів, або суміші цих несправжніх плодів Зміни в розділі «Ідентифікація. А та В» (таблиця характеристики плодів окремих видів глоду). Зміни в розділах «Сторонні домішки», «Втрата в масі при висушуванні». Кількісне визначення (вміст флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид).
Деревій	Авторизований переклад монографії ЄФ «Yarrow»	Зміни в розділі «Ідентифікація. С та D». Кількісне визначення (вміст суми поліфенолів, у перерахунку на пірогалол).
Звіробій	Авторизований переклад монографії ЄФ «St. John's Wort»	Дозвіл на використання висушених квітучих верхівок <i>Hypericum perforatum</i> L., або <i>Hypericum maculatum</i> Crantz (<i>H. Quadrangulum</i> auct. Non L.), або суміші цих видів. Зміни в розділі «Ідентифікація. А та В» Зміни в розділах «Сторонні домішки», «Втрата в масі при висушуванні». Кількісне визначення (вміст флавоноїди, у перерахунку на гіперозид).
Липи квітки	Авторизований переклад монографії ЄФ «Lime flower»	Дозвіл на використання цілих або фрагментованих висушених суцвіть <i>Tilia cordata</i> Millier, <i>Tilia plati</i> . Зміни в розділах «Сторонні домішки», «Втрата в масі при висушуванні».
Нагідок квітки	Авторизований переклад монографії ЄФ «Calendula flower»	Дозвіл на використання квіткових кошиків, а також немахрових форм <i>Calendula officinalis</i> L., що культивуються. Зміни в розділі «Ідентифікація. А та В». Зміни в розділах «Сторонні домішки», «Втрата в масі при висушуванні», «Загальна зола».
Собача кропива	Авторизований переклад монографії ЄФ «Motherwort»	Дозвіл на використання висушених, зібраних під час цвітіння надземних частин <i>Leonurus cardiaca</i> L. або <i>Leonurus quinquelobatus</i> Gilib., або суміші цих видів. Зміни в розділі «Ідентифікація. А, В та С». Зміни в розділах «Сторонні домішки», «Втрата в масі при висушуванні».

ЛРС	Європейська частина	Національна частина
Солодки корені	Авторизований переклад монографії ЄФ «Liquorice root»	Зміни в розділах «Сторонні домішки», «Втрата в масі при висушуванні».
Чистотіл	Авторизований переклад монографії ЄФ «Greater celandine»	Зміни в розділі «Ідентифікація. А та С». Зміни в розділах «Сторонні домішки», «Втрата в масі при висушуванні», «Загальна зола».
Ромашки квітки	Авторизований переклад монографії ЄФ «Matricaria flower»	Зміни в розділі «Ідентифікація. А». Зміни в регламентації вмісту ефірної олії. Зміни в розділі «Сторонні домішки». Кількісне визначення флавоноїдів, у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид.
Квітки та листя глоду	Авторизований переклад монографії ЄФ «Hawthorn leaf and flower»	Дозвіл на використання <i>C. sanguinea</i> Pall.; <i>C. korolkowii</i> L. Henry; <i>C. altaica</i> (Loud.) Lange; <i>C. chlorocarpa</i> Lenne et C. Koch; <i>C. dahurica</i> Koehne ex Schneid.; <i>C. alemanniensis</i> Cin.; <i>C. orientobaltica</i> Cin.; <i>C. curvisepala</i> Lindm.; <i>C. x curonica</i> Cin.; <i>C. x dunensis</i> Cin. Зміни в розділі «Ідентифікація. А».

(в ЄФ — це очищені або неочищені корені, а в ГФ XI — це ретельно очищені від корка корені) запропоновано в національній частині дозволити використання очищених коренів *Althaea officinalis* L. та *Althaea armeniaca* Ten.

Також, враховуючи національні підходи до стандартизації цього виду ЛРС, було запропоновано для включення до національної частини монографії «Артеї корені» методику кількісного визначення полісахаридів [19].

Трава бобівника трилистого. Було проаналізовано 6 серій сировини. З'ясоване наступне: при проведенні ідентифікації сировини методом ТШХ встановлено, що більшість проаналізованих серій сировини не відповідали вимогам ЄФ за регламентованим хроматографічним профілем. Крім того, у монографії ЄФ зони БАР сировини описують відносно зони логаніну, використання якого в якості речовини-свідка не виправдано у зв'язку з його обмеженою доступністю та високою ціною.

Враховуючи це, було розроблено методику ідентифікації сировини за допомогою ТШХ, що дозволяє визначати найбільш значущі біологічно активні сполуки сировини із використанням доступних речовин-свідків, а саме - гіперозиду, рутину і кислоти хлорогенової, та яка враховує якість сировини, що використовується в Україні.

Квітки ромашки. Було проаналізовано 8 серій сировини. Проведені дослідження показали, що методики ЄФ є відтворюваними, але при кількісному визначенні методом ВЕРХ використовується стандартний зразок апігенін-7-глюкозиду, що є дуже дорогим (25 мг (на один аналіз необхідно 10 мг) коштує більше 500 євро). Враховуючи це, а також багатотонажність пе-

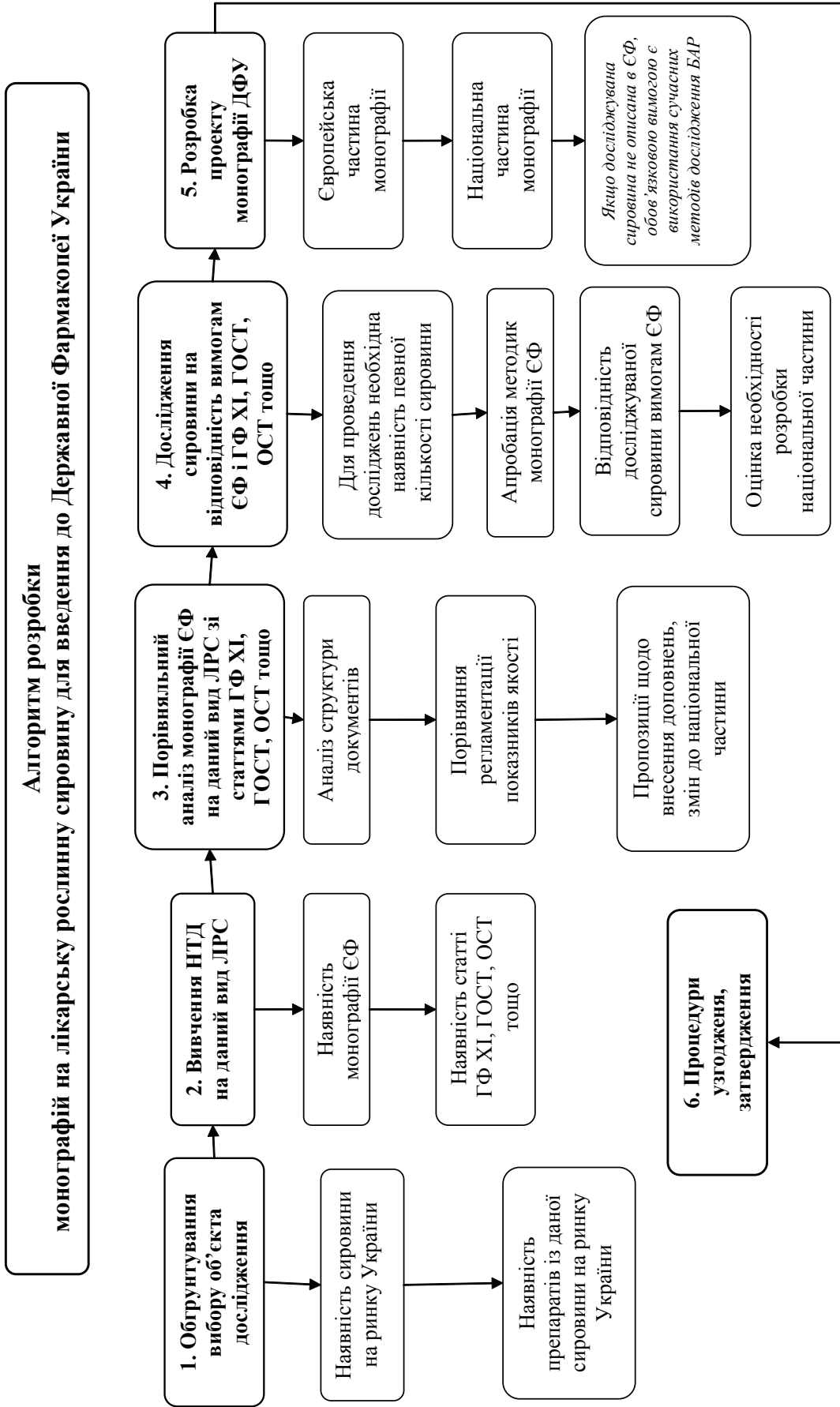
реробки даного виду ЛРС та недостатню оснащеність вітчизняних підприємств рідинними хроматографами, було розроблено та валідовано уніфіковану спектрофотометричну методику кількісного визначення флавоноїдів сировини, у перерахунку на лютеолін-7-глюкозид [28].

Крім того, було показано, що у вітчизняній сировині як вміст домішок, так і вміст ефірної олії не задовольняє регламентованим монографією ЄФ вимогам. Запропоновано до національної частини проекту монографії на квітки ромашки внести зміни до показника «Сторонні домішки» та змінити вимоги до регламентації вмісту ефірної олії, які дозволяють урахувати якість сировини, що використовується в Україні.

Квітки та листя глоду. Було проаналізовано 10 серій сировини. З'ясовано, що методики ЄФ є відтворюваними, речовини-свідки (хлорогенова кислота, рутин) і реактиви є доступними.

Усі проаналізовані зразки не задовольняли вимогам статті ГФ XI «Цветки боярышника» за показниками «Опис», «Макроскопія», «Мікроскопія», у зв'язку з тим, що досліджувані зразки були листками та квітками глоду. Сировина повністю відповідала за цими показниками вимогам ЄФ. Таким чином, було підтверджено необхідність введення до ДФУ саме монографії на квітки та листя глоду [16].

Крім того, був підтверджений попередній висновок про необхідність введення національних вимог щодо використання додаткових видів сировини (наведених в ГФ XI). У зв'язку з цим були проведені дослідження діагностичних ознак усіх видів сировини, показано, що для достовірної ідентифікації ЛРС необхідно враховувати весь комплекс діагностичних морфологічних та анатомічних ознак листків, суцвіть



Рисунок

і квіток, які і запропоновані для введення до розділу «Ідентифікація» національної частини проекту монографії ДФУ [22, 33].

Розробка проектів монографій ДФУ

У результаті проведення наведених вище досліджень проект монографії на ЛРС, являв собою авторизований переклад відповідної монографії ЄФ. У разі необхідності розроблялася національна частина, до якої вносили доповнення, зміни по відношенню до європейської частини.

У Табл. 4 наведено структуру розроблених монографій.

Таким чином, на основі вивчення й аналізу матеріалів раніше проведених досліджень та підходів до побудови проектів монографій на ЛРС [14], нами пропонується такий алгоритм розробки для введення до ДФУ монографій на лікарську рослинну сировину (Рисунок).

Обґрунтування вибору об'єкта дослідження. На даному етапі визначається: наявність обраної сировини на ринку України (вітчизняна, культивована/дикоросла, сировина, що імпортується), наявність препаратів із даної сировини на ринку України.

Вивчення НТД на даний вид ЛРС. Вивчається наявність монографії ЄФ та/або наявність статті ГФ XI, ГОСТ, ОСТ тощо.

Порівняльний аналіз монографії ЄФ на даний вид ЛРС зі статтями ГФ XI, ГОСТ, ОСТ тощо. У першу чергу, проводиться аналіз структури документів, дається оцінка відповідності розділів, підходів до стандартизації, регламентації показників якості. Вносяться пропозиції щодо внесення доповнень, змін до національної частини.

Дослідження сировини на відповідність вимогам ЄФ і ГФ XI, ГОСТ, ОСТ тощо. Для проведення досліджень необхідна наявність певної кількості серій сировини із різних регіонів збору, різних років збору (не більше дворічної давнини), докладної ботанічної характеристики сировини із зазначення місця, часу збирання, сертифіката якості (за можливості). На даному етапі проводиться апробація методик монографії ЄФ з оцінкою можливості їх відтворення. Робиться висновок про наявність реактивів, стандартних зразків в Україні, можливість їх закупівлі за кордоном і доцільність їх використання. Висновок про відповідність досліджуваної сировини вимогам ЄФ та ГФ XI за всіма розділами робиться на підставі Аналітичного листа із результатами дослідження на кожну випробовувану серію сировини. Оцінюється необхідність розробки національної частини.

Розробка проекту монографії ДФУ. Обов'язковою вимогою є дотримання прийнятої у

ДФУ структури монографії. Перша частина монографії - адаптований переклад монографії ЄФ. Якщо необхідно, розробляються методики стандартизації з урахуванням національних вимог з відповідним науковим обґрунтуванням. Валідація методик проводиться відповідно до вимог ДФУ із обов'язковим наданням усіх отриманих валідаційних даних. Якщо досліджувана сировина не описана в ЄФ, обов'язковою вимогою є використання сучасних методів дослідження біологічно активних сполук, специфічних саме для даної сировини.

Надання розробленого проекту та супровідних матеріалів до відгуків ДФУ ДП УНФЦЯЛЗ.

Висновки

Узагальнення даних на прикладі введення до ДФУ 20 монографій на ЛРС показало, що на даному етапі розвитку та створення нормативної бази в Україні відносно ЛРС необхідно дотримуватися досвіду ЄФ у частині структури документа і при розробці методик використовувати достовірні й уніфіковані методики контролю якості. Проте, необхідно використовувати і досвід ГФ XI, і сучасний стан вирощування, збирання, сушіння ЛРС в Україні.

Розробка монографій на ЛРС — кропітке, покрокове обґрунтоване дослідження ботаніків, фармакогностів, фітохіміків, стандартизаторів. Запропонований алгоритм розробки проекту монографії на ЛРС дозволить оцінити необхідний і додатковий об'єми виконуваних робіт для створення монографії, відповідної сучасним вимогам.

ЛІТЕРАТУРА

1. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства: Руководство по качеству. Рекомендации PIC/S / Под ред. Н.А. Ляпунова, В.А. Загорина, В.П. Георгиевского, Е.П. Безуглой. - К.: МОРИОН, 2001. - 472 с.
2. WHO monographs on selected medicinal plants. — Geneva: World Health Organization, 1999. — Vol. 1. — 299 p.
3. WHO monographs on selected medicinal plants. — Geneva: World Health Organization, 2002. — Vol. 2. — 357 p.
4. WHO monographs on selected medicinal plants. — Geneva: World Health Organization, 2004. — Vol. 3. — 376 p.
5. British Pharmacopoeia. — London: HMSO, 2001. — Vol. 1. — 1348 p.
6. Deutsches Arzneibuch. — Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1997. - «Schafgarbenkraut».
7. Проблемы введения монографий на лекарственное растительное сырье в Государственную Фармакопею Украины / Гризодуб А.И., Георгиевский Г.В., Тихоненко Т.М., Георгиевский В.П. // Фармаком. — 2004. - № 4. — С. 3-17.
8. Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations. — EDQM, 2007. — 22 p.
9. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с.

10. European Pharmacopoeia. — 6th ed. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007.
11. European Pharmacopoeia. — 5th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2006.
12. European Pharmacopoeia. — 5th ed. — Sup. 5.6. — Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2005.
13. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1989. — 400 с.
14. Котова Е.Е. Стандартизація препаратів рослинного та тваринного походження, що містять флавоноїди та жирні олії: Автореф. дис. ... к.фарм.н. — Харків, 2005. — 20 с.
15. 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.
16. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Боярышника листья и цветки» / Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г. // Фармаком. — 2005. - № 4. - С. 42-48.
17. Проблемы стандартизации травы пустырника и лекарственных препаратов, приготовленных на ее основе / Котова Э.Э., Тихоненко Н.И., Котов А.Г., Тихоненко Т.М., Вовк А.Г. // Фармаком. — 2006. - № 4. - С. 50-58.
18. Котова Э.Э. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Зверобой» // Фармаком. — 2007. - № 2. - С. 26-33.
19. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Аллея корни» / Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Н.И., Кишук В.М., Тихоненко Т.М. // Фармаком. — 2008. - № 3. - С. 5-10.
20. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Липы цветки» / Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г. // Фармаком. — 2005. - № 1. - С. 54-59.
21. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Ноготков цветки» / Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г. // Фармаком. — 2005. - № 2/3. - С. 128-134.
22. Деякі питання введення у Державну Фармакопею України монографії «Глоду листя та квітки» (видова ідентифікація та морфологічна діагностика) / Вовк О.Г., Котов А.Г., Котова Е.Е., Тихоненко Н.І., Тихоненко Т.М., Шатровська В.І. // Фармаком. — 2008. - № 2. - С. 8-17.
23. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1987. — С. 276.
24. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. — 520 с
25. Ботанико-фармакогностический словарь / Под редакцией Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. — М.: Высшая школа, 1990. — 271 с.
26. Стандартизація плодів боярышника и лекарственных препаратов на их основе по показателю «Количественное определение» / Котова Э.Э., Котов А.Г., Хованская Н.П. // Фармаком. — 2004. - № 4. - С. 35-43.
27. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Бузины цветки» / Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г. // Фармаком. - 2005. - № 1. - С. 47-51.
28. Дашутина С.Л., Котов А.Г., Георгиевский В.П. К вопросу о стандартизации травы чистотела большого // Фармаком. - 2005. - № 2/3. - С. 134-140.
29. Котова Е.Е., Котов А.Г., Чупахіна Є.Ф. Актуальність розробки єдиних підходів до стандартизації якості коренів солодки та препаратів на її основі // Запорізький медичний журнал. - 2007. - № 3. - С. 99-102.
30. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Валерианы корни» / Котова Э.Э., Тихоненко Н.И., Котов А.Г., Тихоненко Т.М., Лукьянова И.С. // Фармаком. - 2007. - № 1. - С. 37-45.
31. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Тысячелистник» / Котова Э.Э., Лукьянова И.С., Котов А.Г., Тихоненко Н.И., Тихоненко Т.М. // Фармаком. - 2007. - № 2. - С. 33-40.
32. Котова Э.Э. Стандартизація цветков ромашки по количественному содержанию суммы флавоноидов // Фармаком. — 2007. - № 3. — С. 17-22.
33. Деякі питання введення до Державної Фармакопеї України монографії «Глоду литстя та квітки» (мікроскопічна діагностика) / Вовк О.Г., Котов А.Г., Котова Е.Е., Тихоненко Н.І., Тихоненко Т.М., Шатровська В.І. // Фармаком. — 2008. - № 4. — С. 21-29.

Резюме

Котов А.Г.

Исследования по разработке и введению монографий на лекарственное растительное сырье в Государственную Фармакопею Украины

Обобщены данные по разработке и введению 20 монографий на ЛРС в ДФУ 1.2. Показано, что на данном этапе создания нормативной базы для ЛРС в Украине необходимо придерживаться опыта ЕФ в части структуры документа, при разработке методик использовать достоверные и унифицированные методы контроля качества. Однако, необходимо использовать и опыт ГФ XI, и учитывать современное состояние выращивания, сбора, сушки ЛРС в Украине. Предложен алгоритм разработки, который позволит оценить необходимый и дополнительный объемы выполняемых работ для создания монографии на ЛРС, соответствующей современным требованиям.

Summary

Kotov A.G.

Study of development and introduction of monographs on herbal drugs into the State Pharmacopoeia of Ukraine

Data of development and introduction of 20 monographs on herbal drug to SPU 1.2 were summarized. It was shown that at this stage of the development of normative base on herbal drugs in Ukraine was necessary to follow an experience of EP in the part of document's structure, at the development to use reliable and standardized methods of quality control. Though, it was necessary also to use an experience of SP XI and modern state of cultivation, collection, drying of herbal drug in Ukraine. An algorithm of the development, which allowed to estimate required and additional volumes of carried out works for the development of the monograph on herbal drug according modern requirements, was proposed.

Котов Андрій Георгійович (н. 1960). Закінчив Харківський фармацевтичний інститут (1982). К.фарм.н. (1996). Ст. наук. співр. (2004). Керівник наукового напрямку «Лікарська рослинна сировина» відділу ДФУ ДП УНФЦЛАЗ.

Фітохімічні дослідження

УДК 543.544:544.77

Куликов А.Ю., Галат М.Н., Бойченко А.П.

Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Оптимизация разделения флавоноидов с использованием метода мицеллярной жидкостной хроматографии

Проведено разделение ряда флавоноидов методом мицеллярной жидкостной хроматографии (МЖХ) в изократическом режиме. Для оптимизации состава подвижной фазы был применен хемометрический подход, и было показано, что оптимальное разделение 14 флавоноидов методом МЖХ проходит с использованием мицеллярной подвижной фазы состава: 0.015 моль/л додецилсульфата натрия в смеси 1-пропанол — фосфатный буферный раствор pH 6.86 — вода (30:200:770). Разработанная методика разделения флавоноидов была использована для количественного определения флавоноидов (лютеолин-7-О-глюкозида и апигенин-7-О-глюкозида) в растительном лекарственном сырье — цветках ромашки лекарственной (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert).

В настоящее время в качестве лекарственных средств широко используются препараты на основе лекарственного растительного сырья. Фармакотерапевтический эффект лекарственных растений обеспечивается наличием в них фармакологически активных веществ. Такими являются преимущественно природные вещества вторичного синтеза (алкалоиды, сапонины, сердечные гликозиды, дубильные вещества и др.), а также вещества из класса липидов, углеводов и витамины [1-4].

Флавоноиды относятся к биологически активным веществам, в основе которых находится дифенилпропановый фрагмент, с основной формулой C₆-C₃-C₆. Они составляют одну из наибольших групп вторичных метаболитов растений; являются типичными растительными красителями, которые играют роль фильтров и защищают ткани растений от УФ-излучения и низких температур [1, 4, 4a].

В зависимости от гетероцикла, а также от структуры и степени окисления пропанового фрагмента выделяют 10 основных типов флавоноидов: катехины, лейкоантоцианидины, антоцианидины, флаваноны, флаванолы, флавоны, флаванолы, халконы, дигидрохалконы и ауруны [1, 4, 6]. Флавоноиды встречаются как в свободном состоянии (агликоны), так и в виде гликозидов (в основном моно- и дисахариды). Основными сахарными остатками являются D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-рамноза, L-арабиноза [2, 5, 6].

Флавоноидные соединения обладают широким диапазоном фармакологического действия, что обуславливает повышенный интерес к их исследованию. Известны их противовоспалительные, антиокислительные, противовирус-

ные и другие эффекты [2]. Разделение флавоноидов с последующей идентификацией возможно с применением хроматографических методов (тонкослойная, газовая, жидкостная хроматографии) и капиллярного электрофореза [3, 5-9]. Наибольшего распространения среди этих методов получила обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ).

Хроматографическое разделение флавоноидов, относящихся к различным классам, несколько затруднительно и, как правило, требует применения градиентного элюирования. Например, Сакакибара с соавторами [10] предложил методику одновременного разделения простых полифенолов, флавонов, флаванолов, флаванонов, изофлавонов, катехинов, теафлавинов, антоцианинов, антрахинонов и халконов с использованием колонки Carcell rak C18. Компоненты смеси были разделены в течение 95 мин с применением градиентного элюирования. Меркен и Бичер разделили 17 агликонов флавоноидов [11] на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 в режиме градиентного элюирования в течении 50 мин.

Крозиер с соавторами для разделения и определения флавоноидов в различных овощах использовали градиент вода — ацетонитрил с добавкой трифторуксусной кислоты и колонку Symmetry C18. Разделение рутина, кверцетрина, мирицетина, кверцетина, лютеолина, апигенина, кемпферола и изорамнетина было проведено за 25 мин [12].

Известны случаи определения флавоноидов с помощью мицеллярной электрокинетической хроматографии, например, определение катехина, кверцетина, нарингенина, апигенина,

кемпферола и мирицетина в вине [13]. В качестве подвижной фазы использовался раствор 0.040 моль/л додецилсульфата натрия в присутствии 20 % (об/об) 1-пропанола и боратного буферного раствора (рН 9.0).

Мицеллярная жидкостная хроматография (МЖХ) — одна из разновидностей жидкостной хроматографии, которая находит все большее применение в анализе сложных смесей веществ благодаря уникальной селективности разделения [14]. Подвижная фаза в МЖХ представляет собой водные растворы поверхностно-активных веществ (ПАВ) с концентрацией выше критической концентрации мицеллообразования, т.е. в растворе одновременно присутствуют молекулы ПАВ и их микроагрегаты — мицеллы [15]. Для увеличения эффективности разделения в мицеллярные подвижные фазы вводятся небольшие добавки органических модификаторов. Наибольшее распространение в этом случае получили нормальные и разветвленные алифатические спирты, например, пропанол, бутанол, пентанол [16-20].

Преимущества МЖХ заключаются в возможности одновременного разделения заряженных и незаряженных, а также гидрофильных и гидрофобных сорбатов. Способность мицелл ПАВ к солюбилизации мало растворимых в воде веществ дает возможность существенно упростить процесс пробоподготовки. Например, при анализе физиологических жидкостей становится возможным определение интересующих компонентов так называемым прямым вводом пробы, т.е. вводом пробы в колонку без отделения белковой матрицы [15, 21, 22]. Кроме того, в МЖХ наблюдается уменьшение содержания органических растворителей по сравнению с ОФ ВЭЖХ, что соответствует принципам «Green Chemistry» — снижается токсичность и воспламеняемость подвижной фазы.

Мицеллярными подвижными фазами можно заменить традиционные водно-органические подвижные фазы в фармацевтическом анализе, например определение сульфаметоксазола и триметоприма в таблетках «Бисептол» [23], азитромицина в таблетках и суспензии азитромицина [24] и др. Методика определения дельтаметрина в противоблошиных шампунях методом МЖХ [25] демонстрирует еще одну возможность упростить пробоподготовку. ВЭЖХ методика предполагает предварительную многостадийную экстракцию активного компонента из образца шампуня, в состав которого входит до 70 % анионных и неионогенных ПАВ. МЖХ позволяет проанализировать вышеуказанный образец после разведения мицеллярной под-

вижной фазой и тем самым исключить трудоемкую пробоподготовку.

МЖХ была использована для разделения простых полифенолов (тирозол, кофейная кислота и др.) и фосфолипидов в оливковом масле [26] с использованием раствора SDS (0.07 моль/л) с добавками 1-пропанола (2.5 % об/об) в качестве подвижной фазы. В работе отмечается возможность прямого введения образцов, содержащих оливковое масло от 30 % до 65 %, в колонку без увеличения давления на колонке. Также интересен тот факт, что в ранее предложенной ВЭЖХ методике определения полифенолов в оливковом масле [27] используется градиентный режим элюирования, а одновременное разделение полифенолов и фосфолипидов обуславливается исключительными возможностями МЖХ и, скорее всего, не возможно в рамках ОФ ВЭЖХ.

Цель данной работы - изучение возможности разделения флавоноидов методом МЖХ в изократическом режиме элюирования; выбор качественного состава подвижной фазы и оптимальной подвижной фазы для разделения ряда флавоноидов; применение полученных данных к анализу реального объекта — лекарственного растительного сырья.

Экспериментальная часть

Реактивы. Использованные в работе робинин, рутин, гиперозид, кверцитрин, мирицетин, физетин, кверцетин, кемпферол, лютеолин, апигенин, ликурозид, изосалипурпозид, лютеолин-7-О-глюкозид и апигенин-7-О-глюкозид предоставлены к.фарм.н. А.Г. Котовым, д.х.н., профессором В.И. Литвиненко (ГП ГНЦАС) и профессором А.Д. Рошалем (НИИ химии при Харьковском национальном университете им. В.Н. Каразина). Структурные формулы флавоноидов представлены на Рис. 1.

Для приготовления подвижных фаз использовали додецилсульфат натрия (SDS) и 1-пропанол (1-PrOH) фирмы «Fluka Chemie» (Швейцария).

Фосфатный буферный раствор рН 6.86 готовили из фиксаналов (ГОСТ 8.135-74 Стандарттитры для рН-метрии).

Исходные растворы флавоноидов готовили растворением точных навесок в смесях этанола:вода 50:50 (% (об/об)) и 90:10 (% (об/об)); рабочие растворы получали разведением исходных растворов в мицеллярной подвижной фазе до получения растворов с конечными концентрациями флавоноидов около 20 мкг/мл. Исходные растворы хранились при температуре около 10 °С.

Оборудование. Хроматографические измерения были проведены на жидкостном хроматографе Hewlett Packard 1050 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), снабженном интегратором серии 3395. Хроматографическая колонка — Ultrasphere ODS (250 мм×4.6 мм, 5 мкм, Beckman Instruments, Fullerton, USA). Разделение проводили при температуре (40.0±0.1) °С, скорость подвижной фазы 1.0 мл/мин, объем вводимой пробы — 10 мкл.

Спектрофотометрические исследования выполнены на спектрофотометре HP 8453 UV-VIS spectrophotometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Значение pH подвижных фаз контролировали с помощью pH-метра Beckman Ф-200 pH meter (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

Программное обеспечение. Статистические расчеты проводили при помощи Microsoft Excel (2002, Microsoft Corporation, <http://office.microsoft.com>) и Matlab 7.0 (2004, The Mathworks, <http://www.mathworks.com>). Для получения расчетных значений логарифмов констант распределения флавоноидов в системе 1-октанол — вода использовали программу ACD Labs (ACD/Labs 10, www.acdlabs.com).

Результаты исследований и их обсуждение

Выбор длины волны детектирования. Для выбора оптимальной длины волны детектирования были получены УФ-спектры флавоноидов (концентрация исследуемого флавоноида около 0.01 г/л) в мицеллярной среде (0.04 моль/л SDS, 2 % (об/об) 1-PrOH). Сравнение спектров флавоноидов, полученных в мицеллярных и водно-органических (2 % (об/об) 1-PrOH) средах показало, что для большинства веществ в мицеллярной среде характерны увеличение поглощения (мирицетин, физетин, робинин, изосалипурпозид, кверцетин, кемпферол, кверцетрин) и/или сдвиг максимума (лютеолин, физетин, изосалипурпозид). Аномальное уменьшение светопоглощения наблюдалось только для рутина (Рис. 2).

Большинство спектров имеют два максимума поглощения: первый в области длин волн от 240 нм до 280 нм, второй в области длин волн от 340 нм до 380 нм [2-4]. Второй максимум является характеристическим для флавоноидов, и, исходя из этого, в качестве длины волны детектирования при разделении смеси флавоноидов была выбрана длина волны 355 нм.

Выбор качественного состава мицеллярной подвижной фазы. Были проведены предварительные исследования по изучению факторов удерживания флавоноидов от канцен-

трации ПАВ, вида и концентрации спирта-модификатора и pH.

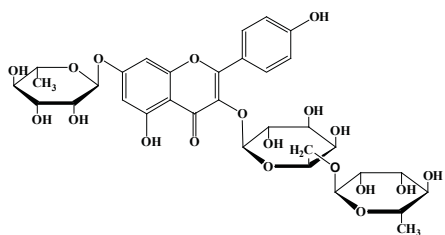
В качестве мицеллообразующего ПАВ выбрано анионное ПАВ додецилсульфат натрия, который наиболее часто используется в МЖХ. Подвижные фазы на основе индивидуальных растворов ПАВ не показали хорошего результата: глюкозиды имели приемлемое время удерживания, в то время как удерживание агликонов было очень большое. Исходя из этого, было решено использовать растворы ПАВ, модифицированные небольшими добавками спиртов, что должно, с одной стороны, уменьшить время анализа, с другой — увеличить эффективность разделения [8]. В качестве модификаторов были опробованы 1-пропанол, 1-бутанол и 1-пентанол (объемные доли спиртов составляли 1 %). Лучшее разделение удалось получить при использовании 1-пропанола; применение в качестве модификаторов 1-бутанола и 1-пентанола не дало желаемого результата. Это хорошо согласуется с рекомендациями, которые даны в работе [28], где для разделения полярных веществ с $-1 < \log P_{o/w} < 2$ (Рис. 1) предлагается использовать 1-пропанол в качестве модификатора ($\log P_{o/w}$ — коэффициент распределения октанол - вода).

Также было изучено влияние pH на удерживание флавоноидов. Использование кислых подвижных фаз (pH < 4) не дало удовлетворительного разделения, и в дальнейшем решено было перейти к нейтральной области pH. Исследования, проведенные в диапазоне pH от 5.0 до 7.5, показали, что лучшего разделения можно добиться при значении pH подвижной фазы около 7. В качестве pH-поддерживающего компонента был выбран фосфатный буфер pH 6.86.

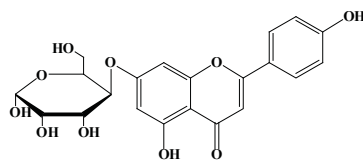
Оптимизация состава подвижной фазы. Для оптимизации разделения 14 флавоноидов использовался недавно предложенный хемометрический подход [19, 29], который основан на моделировании удерживания каждого флавоноида на основании экспериментальных данных об их удерживании для нескольких подвижных фаз в соответствии с планом эксперимента, последующем дроблении диапазона изменения содержания SDS и модификатора в мицеллярном элюенте и расчете глобального разделения в каждой моделируемой точке.

Для получения параметров моделей удерживания исследовали удерживание флавоноидов для 12 подвижных фаз. Концентрацию SDS варьировали от 0.020 моль/л до 0.040 моль/л, объемную долю 1-пропанола от 0.5 % до 3.0 %. Факторы удерживания рассчитывали на осно-

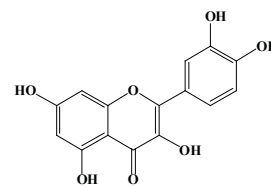
Рисунок 1



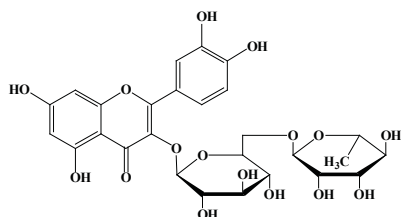
Робинин (фларонин) (1)
log P = -2.87



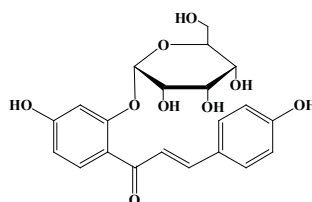
Апигенин-7-О-глюкозид (7)
log P = 0.06



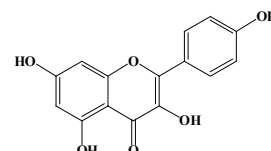
Кверцетин (13)
log P = 0.35



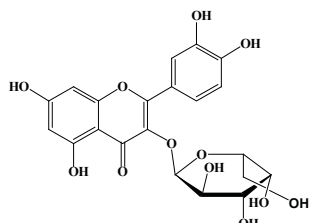
Рутин (2)
log P = -2.28



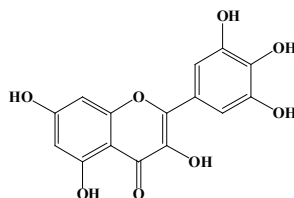
Изосалипурпозид (8)
log P = 0.58



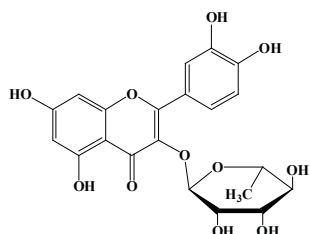
Кемпферол (14)
log P = 0.74



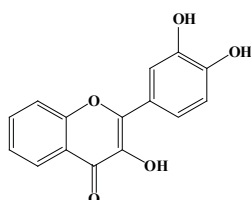
Гиперозид (3)
log P = -1.39



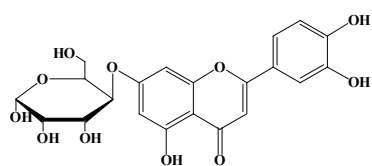
Мирицетин (9)
log P = -0.04



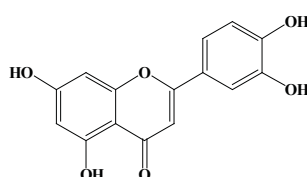
Кверцитрин (4)
log P = -1.39



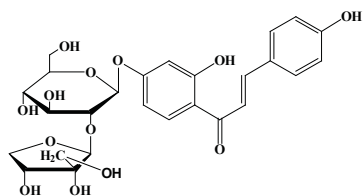
Физетин (10)
log P = 1.13



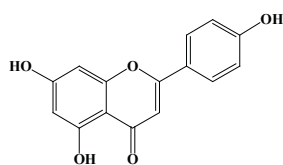
Лютеолин-7-О-глюкозид (5)
log P = -0.33



Лютеолин (11)
log P = 1.51



Ликурозид (6)
log P = -0.73



Апигенин (12)
log P = 1.90

Структурные формулы флавоноидов

вании полученных времен удерживания с использованием мертвого времени колонки, определяемого как время удерживания нитрата натрия (100 мкг/мл). Удерживание каждого флавоноида моделировали по простой эвристической модели (1), которая следует из физико-химической модели удерживания, основанной на квазихимической концепции мицеллообразования [30].

$$\log k = a + b \log c_s + c \log c_R, \quad (1)$$

где:

k — фактор удерживания;

c_s — концентрация SDS;

c_R — концентрация 1-пропанола.

Ранее нами было показано, что модель обладает хорошей описательной и предсказательной способностями [30, 31]. Параметры модели для каждого флавоноида рассчитывали при помощи взвешенного метода наименьших квадратов, чтобы принять во внимание изменение вида распределения ошибок при логарифмировании моделируемой функции. Статистические веса рассчитывали на основе правила распространения ошибок. Полученные модели затем использовали для расчета удерживания флавоноидов в каждой из 1600 точек, на которые было разбито факторное пространство, ограниченное минимальным и максимальным содержанием SDS и 1-пропанола. Фактор разделения между каждой парой пиков рассчитывали по формуле:

$$S_{i,i+1} = \frac{k_{i+1} - k_i}{k_{i+1} + k_i + 2}, \quad (2)$$

где:

k_{i+1}, k_i — факторы удерживания соседних пиков.

Для оценки качества разделения пиков на всей хроматограмме (глобальный критерий) рассчитывали произведение значений элементарных критериев (факторов разделения):

$$R = \prod_{i=1}^p S_{i+1,i}, \quad (3)$$

где:

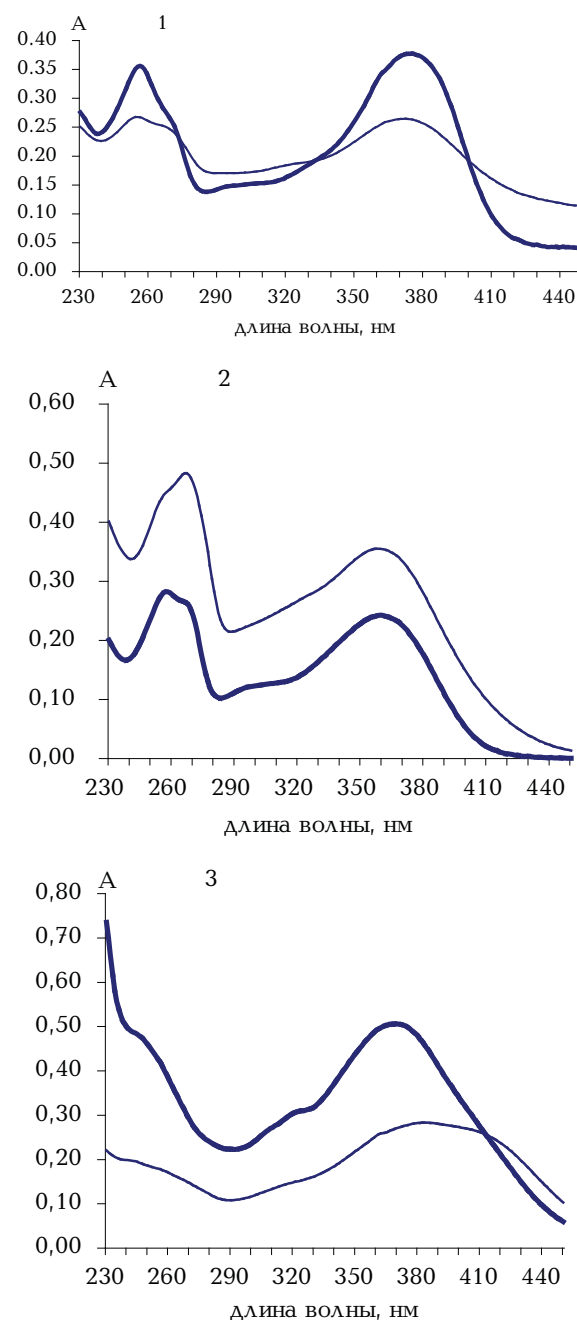
$\prod_{i=1}^p S_{i+1,i}$ — произведение факторов разделения для всех пар пиков;

p — число пар пиков, равное числу пиков минус один.

После этого рассчитанные значения R для каждой точки факторного пространства нормализовали, приписывая 1 максимальному значению и 0 минимальному рассчитанному значению R .

На Рис. 3 А представлена контурная карта зависимости глобального критерия разделения

Рисунок 2



Спектры поглощения кверцетина (1), рутина (2) и физетина (3) в мицелярной (—) и водно-органической средах (---)

от содержания SDS и 1-пропанола в подвижной фазе. Очевидно, что качество разделения 14 флавоноидов увеличивается с уменьшением содержания SDS и 1-пропанола. Интересно, что в других областях значение глобального критерия остается низким и область оптимальных условий разделения лежит за пределами изученной области содержаний SDS и 1-пропанола. Поэтому для определения оптимальных условий разделения необходимо рас-

Таблица

Массовая доля лютеолин-7-О-глюкозида и апигенин-7-О-глюкозида в цветах ромашки лекарственной (*Chamomilla recutita* (L) Rauchert), в пересчете на сухое сырье

Образец	Лютеолин-7-О-глюкозид	Апигенин-7-О-глюкозид
1	0.123±0.004	0.326±0.005
2	0.038±0.005	0.251±0.005
3	0.033±0.002	0.125±0.003

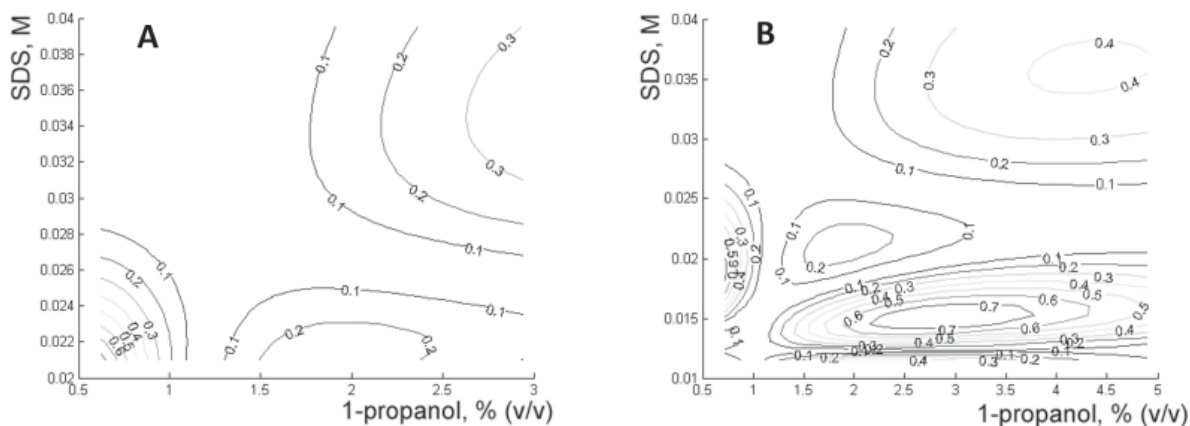
ширить исследованный диапазон содержаний компонентов подвижной фазы. Недавно было показано, что использованная нами трехпараметрическая модель удерживания имеет хорошую предсказательную способность даже за пределами области, для которой получены экспериментальные данные. Поэтому мы попытались предсказать поведение глобального критерия разделения 14 флавоноидов вне области, ограниченной экспериментальными точками. На Рис. 3 В представлена контурная карта разделения 14 флавоноидов, где концентрация SDS варьируется от 0.010 моль/л до 0.040 моль/л, а содержание 1-пропанола — от 0.5 % до 5.0 % (по объему). Область оптимальных условий разделения на этой контурной карте расположена между 0.014 моль/л и 0.016 моль/л SDS и 2.2 % и 3.7 % (об/об) 1-пропанола.

С использованием подвижной фазы, состав которой соответствует центру области максимума глобального разделения (0.015 моль/л SDS, 3.0 % 1-пропанола), была экспериментально получена хроматограмма разделения 14 флавоноидов (Рис. 4 А). При этом оказалось, что экспериментально полученная и прогнозируемая хроматограммы (Рис. 4 А и 4 В) хорошо согласуются, что подтверждает возможность применения хемометрического подхода к оптимизации разделения и за пределами диапазона

экспериментально полученных данных об удерживании каждого аналита. Дополнительно для подтверждения нашего вывода были получены хроматограммы смеси флавоноидов с использованием подвижных фаз, состав которых не входит в вышеуказанную оптимальную область (0.014 – 0.016) моль/л SDS; (2.2 – 3.7) % (об/об) 1-пропанола). Полученные хроматограммы представлены на Рис. 5. Согласно полученным экспериментальным данным для разделения ряда флавоноидов можно использовать более широкую область составов подвижных фаз: концентрация SDS от 0.014 моль/л до 0.018 моль/л и объемная доля 1-пропанола от 2.0% до 4.5%. Поэтому в дальнейших исследованиях по количественному определению некоторых флавоноидов в реальных объектах выбор состава подвижной фазы осуществлялся в данном диапазоне и зависел от степени разделения веществ, времени анализа и прочих условий.

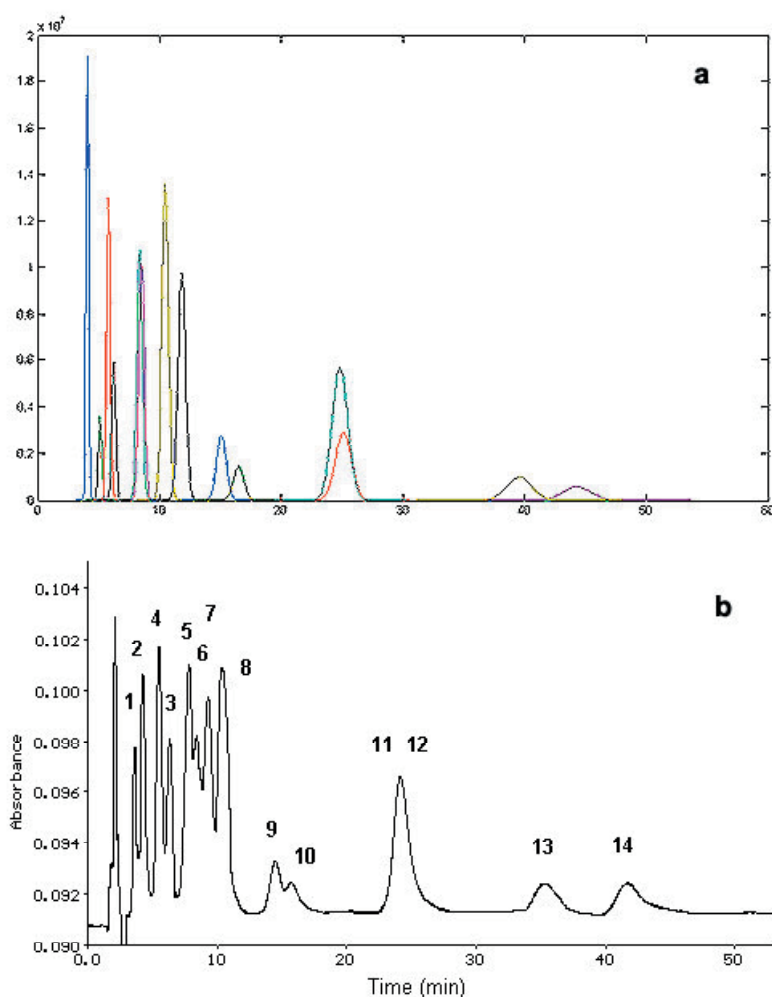
Определение содержания апигенин-7-О-глюкозида и лютеолин-7-О-глюкозида в лекарственном растительном сырье цветов ромашки лекарственной методом МЖХ. Полученные данные по разделению ряда флавоноидов решено было применить к анализу реального объекта. В качестве последнего были выбраны цветы ромашки лекарственной, содержащие, согласно литературным данным [32], апигенин-7-О-

Рисунок 3



Контурная карта зависимости нормализованного разделения от концентрации додецилсульфата натрия и содержания 1-пропанола: А — область экспериментальных данных, В — расширенная область

Рисунок 4



Экспериментально полученная (А) и прогнозируемая (В) хроматограммы 14 флавоноидов. Подвижная фаза: 0.015 моль/л SDS, 3.0 % 1-PrOH, pH 6.9; $\lambda = 355$ нм

глюкозид и минорные количества лютеолин-7-О-глюкозида.

Согласно Европейской Фармакопее [33], определение апигенин-7-О-глюкозида проводится методом ВЭЖХ в градиентном режиме (растворитель А: 0.5 % H_3PO_4 , 99.5 % H_2O ; растворитель Б: 0.5 % H_3PO_4 , 99.5 % CH_3CN). Время хроматографирования одной пробы в этих условиях составляет около 50 мин.

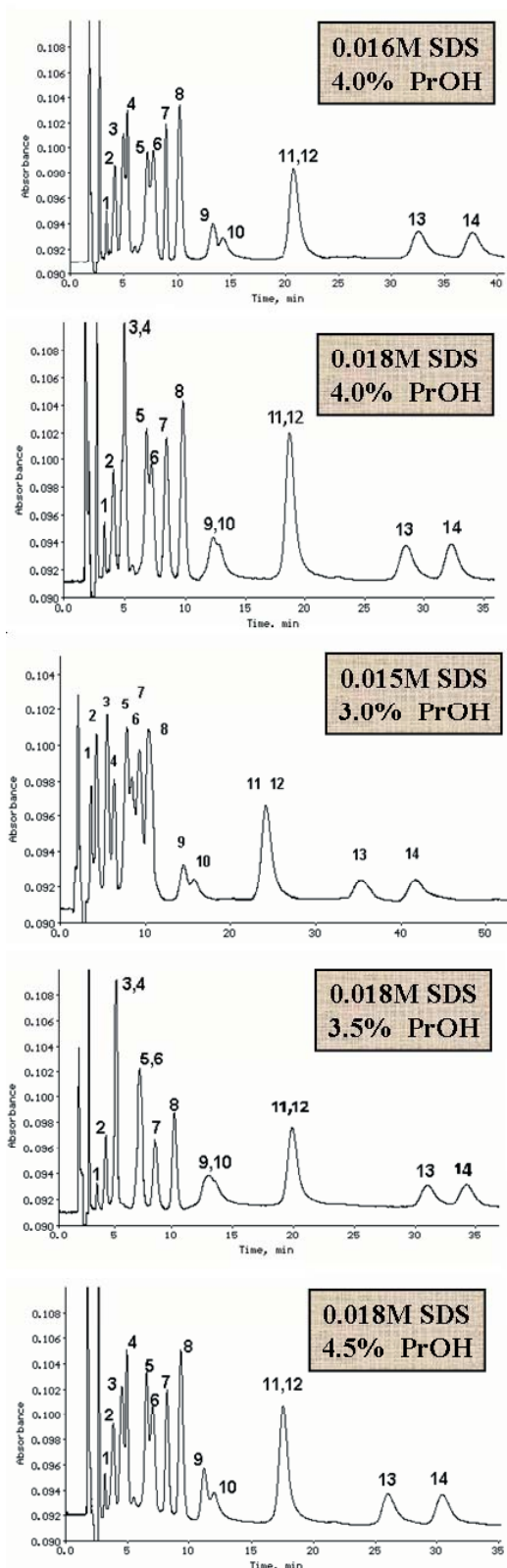
Определение апигенин-7-О-глюкозида и лютеолин-7-О-глюкозида методом МЖХ проводилось в изократическом режиме с использованием подвижной фазы состава 0.018 моль/л SDS, 2.0 % 1-PrOH, pH 6.9. Пробоподготовка была проведена в соответствии с методикой, описанной в Европейской Фармакопее [33].

Типичные хроматограммы стандартных образцов и образцов цветов ромашки лекарствен-

ной представлены на Рис. 6. Идентификацию пиков проводили по сравнению времен удерживания и сравнению УФ-спектров, полученных в потоке. Это позволило доказать, что пик I соответствует пику лютеолин-7-О-глюкозида.

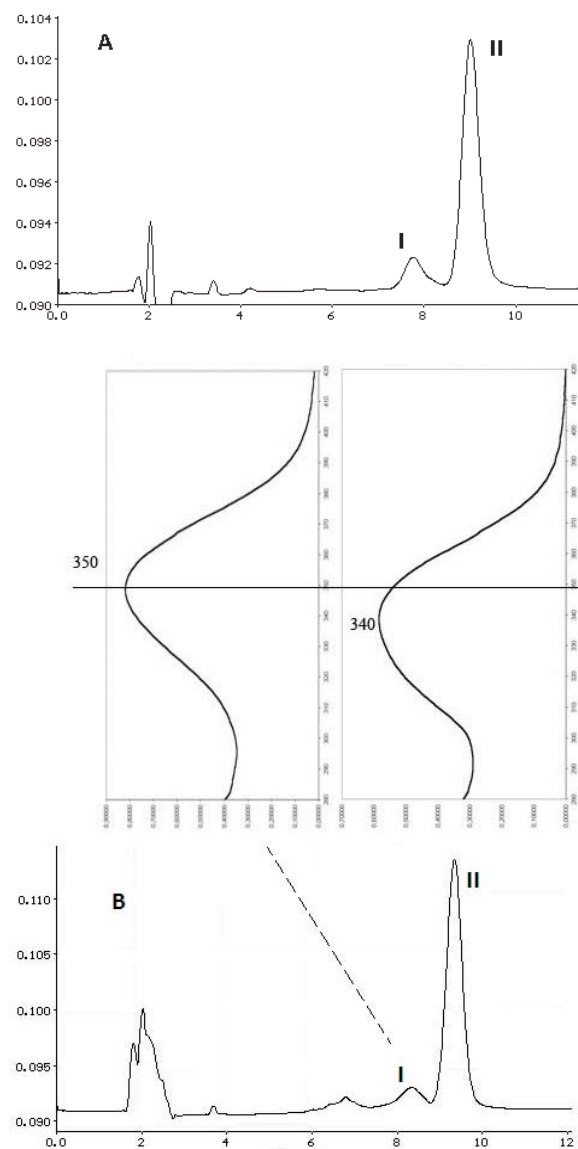
Результаты определения содержания лютеолин-7-О-глюкозида и апигенин-7-О-глюкозида в цветах ромашки, полученных от различных производителей, представлены в Таблице. Также были определены некоторые валидационные характеристики предложенной методики. Диапазон линейности для лютеолин-7-О-глюкозида составил (15.1 - 302.0) мкг/мл, для апигенин-7-О-глюкозида – (12.2 - 243.7) мкг/мл. Уравнение линейной зависимости площади пика от концентрации определяемого компонента имеет вид $S = (1.0 \pm 0.1) \cdot 10^5 + (90.9 \pm 0.7) \cdot 10^2 C$ ($R = 0.9994$) для лютеолин-7-О-глюкозида и

Рисунок 5



Хроматограммы разделения флавоноидов, полученные с использованием подвижных фаз из оптимального диапазона (концентрация SDS от 0.014 моль/л до 0.018 моль/л; объемная доли 1-пропанола от 2.2 % до 4.5 %)

Рисунок 6



Подвижная фаза: 0.020 моль/л SDS, 1.5 % 1-PrOH, pH 6.9; $\lambda = 340$ нм
 I — лютеолин-7-О-глюкозид, II — апигенин-7-О-глюкозид

Хроматограмма стандартных образцов (A) и цветков ромашки лекарственной (B).

$S = (9.2 \pm 0.5) \cdot 10^4 + (65.0 \pm 0.3) \cdot 10^2 C$ ($R = 0.9997$) для апигенин-7-О-глюкозида. Предел обнаружения для лютеолин-7-О-глюкозида и апигенин-7-О-глюкозида составляет 4.25 мкг/мл и 3.61 мкг/мл, а предел количественного определения — 12.90 мкг/мл и 10.92 мкг/мл, соответственно.

Выводы

В результате проведенных исследований была показана возможность использования мицелярной жидкостной хроматографии для исследования флавоноидной части раститель-

ного лекарственного сырья. Основываясь на новом хеометрическом подходе был выбран оптимальный диапазон состава подвижных фаз для разделения 14 флавоноидов: концентрация додецилсульфата натрия от 0.014 моль/л до 0.018 моль/л, объемная доля 1-пропанола от 2.0 % до 4.5 %; рН подвижной фазы обеспечивалось добавками фосфатного буферного раствора рН 6.86. В рамках указанного диапазона концентраций возможно разделение и количественное определение флавоноидов растительного лекарственного сырья.

Методика с использованием мицеллярной жидкостной хроматографии была применена для количественного определения лютеолин-7-О-глюкозида и апигенин-7-О-глюкозида в цветках ромашки лекарственной (*Chamomilla recutita* (L.) Rauchert).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин — Харків: Прапор, 2000. — 703 с.
2. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. - Новосибирск: Наука, 1990. - 332 с.
3. Георгиевский В.П. Исследование физико-химических свойств флавоноидов, кумаринов и антрахинонов с целью разработки методов анализа некоторых фитохимических препаратов: Автореф. дисс. д.фарм.н. - Харьков, 1981. - 45 с.
4. Литвиненко В.И. Природные флавоноиды // Технология и стандартизация лекарств: Сб. науч. тр. / Под ред. В.П. Георгиевского, Ф.А. Конева. — ООО «РИРЕГ», 1996. - С. 103-153.
- 4а. Комиссаренко Н.Ф. Фенольные соединения, их распространение в природе и биологическая активность // Там же. - С. 28-53.
5. Analytical separation and detection methods for flavonoids / De Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.Th. // J. Chromatogr. A. — 2006. — Vol. 1112. — P. 31-63.
6. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications / Ed. by Andersen Q.M., Markham K.R. — Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2006. — 1197 p.
7. Stefova M., Stafilov T., Kulevanova S. HPLC Analysis of Flavonoids. In Encyclopedia of Chromatography. - Marcel Dekker Inc., New York, 2003.
8. Tokusoglu Ö., Ünal M.K., Yildirim Z. HPLC-UV and GC-MS characterization of the flavonol aglycons quercetin, kaempferol, and myricetin in tomato pastes and other tomato-based products // Acta Chromatographica. — 2003. — №. 13. — P. 196—207.
9. Determination of Flavonoids, Flavonoid Glycosides and Biflavonoids in *Olea europaea* L. Leaves / Heimler D., Pieroni A., Tattini M., Cimato A. // Chromatographia. — 1992. — Vol. 33, № 7-8. — P. 369—373.
10. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas / Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K. // J. Agric. Food Chem. — 2003. — Vol. 51. — P. 571—581.
11. Merken H.M., Beecher G.R. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones // J. Chromatogr. A. — 2000. — Vol. 897. — P. 177—184.
12. Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery / Crozier A., Lean M.E.J., McDonald M.S., Black Ch. // J. Agric. Food Chem. — 1997. — Vol. 45. — P. 590—595.
13. Determination of potentially anti-carcinogenic flavonoids in wines by micellar electrokinetic chromatography / Sun Y., Fang N., Chen D.D.Y., Donkor K.K. // Food Chem. — 2008. — Vol. 106. — P. 415—420.
14. Dorsey Y.G. Micellar liquid chromatography // Adv. Chromatogr. — 1987. — Vol. 27. — P. 167.
15. Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Micellar Liquid Chromatography — Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2000. — 632 p.
16. Dorsey J.G., DeEchegaray M.T., Landy J.S. Efficiency Enhancement in Micellar Liquid Chromatography // Anal. Chem. — 1983. — Vol. 55. — P. 924-928.
17. Gonzalo-Lumbreras R., Izquierdo-Hornillos R. Method development for corticosteroids and anabolic steroids by micellar liquid chromatography // J. Chromatogr. B. — 2003. — Vol. 794. — P. 215-225.
18. Torres-Cartas S., Villanueva-Camanas R.M., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Determination of steroidal hormones in urine samples by micellar liquid chromatography following solid-phase extraction // J. Liq. Chrom. Rel. Technol. — 2001. — Vol. 24, № 8. — P. 1089-1103.
19. MLC Determination of Preservatives in Cranberry Foodstuffs / Loginova L.P., Kulikov A.U., Yakovleva E.Y., Boichenko A.P. // Chromatographia. — 2008. — Vol. 67, № 7-8. — P. 615-620.
20. Kulikov A.U., Loginova L.P., Samokhina L.V. Influence of Various Factors on the Chromatographic Behavior of Cytostatic Antibiotics of Rubomicin Derivatives in Micellar Liquid Chromatography // Chromatographia. — 2003. — Vol. 57, № 7-8. — P. 463-469.
21. Басова Е.М., Иванов В.М., Шпигун О.А. Мицеллярная жидкостная хроматография // Успехи химии. — 1999. — Т. 68, № 12. — P. 1083-1101.
22. Куликов А.Ю., Логинова Л.П., Самохина Л.В. Мицеллярная жидкостная хроматография в фармацевтическом анализе и других областях анализа (обзор) // Фармаком. — 2004. — № 1. — С. 22-52.
23. Kulikov A.U., Verushkin A.G., Loginova L.P. Comparison of Micellar and Reversed-Phase Liquid Chromatography Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim // Chromatographia. — 2005. — Vol. 61, № 9-10. — P. 455-463.
24. Kulikov A.U., Verushkin A.G. Development and Validation of Micellar Liquid Chromatography Method with UV Detection for Determination of Azithromycin in Tablets and Capsules // Chromatographia. — 2004. — Vol. 60, № 1-2. — P. 33-38.
25. Kulikov A.U. Determination of Pyrethroid Insecticide Deltamethrin by Micellar Liquid Chromatography with Spectrophotometric Detection // Chromatographia. — 2007. — Vol. 66, № 5-6. — P. 303-309.
26. Jimenez M.S., Velarte R., Castillo J.R. Direct determination of phenolic compounds and phospholipids in virgin olive oil by micellar liquid chromatography // Food Chem. — 2007. — Vol. 100. — P. 8-14.
27. Determination of phenols, chalcones and ligands in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode-array ultraviolet detection / Mateos R., Espartero J.L., Trujillo M., Rios J.J., Leon-Camacho M., Alcludia F. // J. Agric. Food Chem. — 2001. — Vol. 49. — P. 2185-2192.
28. Micellar liquid chromatography: suitable technique for screening analysis / Ruiz-Angel M.J., Caballero R.D., Simo-Alfonso E.F., Garcia-Alvarez-Coque M.C. // J. Chromatogr. A. — 2002. — Vol. 947. — P. 31-45.
29. Бойченко А.П. Моделювання утримування та оптимізація розділення в мицеллярній рідинній хроматографії: Дис ... к.х.н. - Харків, 2008. - 150 с.
30. Micellar liquid chromatography retention model based on mass-action concept of micelle formation / Loginova L.P.,

Samokhina L.V., Boichenko A.P., Kulikov A.U. // J. Chromatogr. A. — 2006. — Vol. 1104. — P. 190-197.

31. Heteroscedasticity of retention factor and adequate modeling in micellar liquid chromatography / Boichenko A.P., Iwashchenko A.L., Loginova L.P., Kulikov A.U. // Anal. Chim. Acta. — 2006. — Vol. 576. — P. 229-238.

32. Bisset N.G., Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. — Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1994. — 482 p.

33. European Pharmacopoeia. — 6th ed. - Vol. 2. — European Directorate for the Quality of Medicines, 2007. - P. 2340.

Резюме

Куликів А.Ю., Галат М.М., Бойченко О.П.

Оптимізація розділення флавоноїдів із використанням методу міцелярної рідинної хроматографії

Проведено розділення ряду флавоноїдів методом міцелярної рідинної хроматографії (МРХ) в ізократичному режимі. Для оптимізації складу рухомої фази був застосований хемометричний підхід, і було показано, що оптимальне розділення 14 флавоноїдів методом МРХ проходить із використанням міцелярної рухомої фази складу: 0.015 моль/л додецилсульфату натрію у суміші 1-пропанол-фосфатний буферний розчин рН 6.86 - вода (30:200:770). Розроблену методику розділення флавоноїдів було використано для кількісного визначення флавоноїдів (лютеолін-7-О-глюкозиду й апігенін-7-О-глюкозиду) у рослинній лікарській сировині — квітках ромашки лікарської (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert).

Summary

Kulikov A.Yu., Galat M.N., Boychenko A.P.

Optimization of the separating of flavonoids with the use of micellar liquid chromatography

The separation of a number of flavonoids with the use of micellar liquid chromatography (MLC) in isocratic conditions was conducted. For the optimization of mobile phase has been used chemometric approach and has been shown that optimal separation of 14 flavonoids with the use of MLC took place with the use of micellar mobile phase with the content of 0.015 mol/l sodium dodecyl sulfate in the mixture 1-propanol — phosphate buffer solution pH 6.86 — water (30:200:770). Developed method of the separation of flavonoids was used for the assay of flavonoids (luteoline-7-O-glucoside and apigenine-7-O-glucoside) in herbal drug — flowers of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert.

Куликів Артем Юрьевич. Окончил Харьковский государственный университет (1993). К.х.н. (1996). Ст. науч. сотр. лаборатории фармакопейного анализа ГП УНФЦКЛС.

Галат Марина Николаевна. Окончил Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина (2006). Аспирант кафедры химической метрологии ХНУ.

Бойченко Александр Павлович. Окончил Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (2005). К.х.н. (2008). Научный сотрудник кафедры химической метрологии ХНУ.

УДК 635.356:543.544:547.491.4

Ханін В.А., Владимірова І.М., Кисличенко В.С.
Національний фармацевтичний університет

Вивчення біологічно активних речовин брокколі методом хромато-мас-спектрометрії

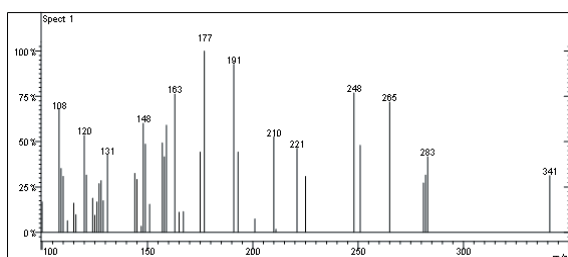
Методом газової хромато-мас-спектрометрії у траві капусти брокколі ідентифіковано та встановлено структуру 8 сполук, із яких — 1 меркаптосполука, 1 похідне індолу, 1 похідне сесквітерпеноїду типу гвайану, 1 похідне аліфатичної кислоти та 4 алкілізотіоціанати; у біологічно активній рідині брокколі — 1 похідне індолу та 6 сірковмісних сполук, із яких — 1 меркаптосполука та 5 ізотіоціанатів: 4 алкілізотіоціанати та 1 арілізотіоціанат.

Досвід використання капусти брокколі як лікарської рослини відкриває нові можливості. Її рекомендують при атеросклерозі, захворюваннях шлунка, печінки. Пилок квітучої рослини, настояний у теплій медовій воді, — ефективний засіб проти променевої хвороби [2, 5, 7, 8]. Встановлено, що проросле насіння брокколі діє як профілактичний антиканцерогенний засіб, перешкоджаючи розвитку ракових клітин [4, 6, 9, 13]. Такі багатопланові терапевтичні властивості обумовлені не лише наявністю різних груп біологічно активних речовин (БАР) — макро- та мікроелементів, амінокислот, флавоноїдів, суми окиснювальних поліфенолів, пектинових речовин, полісахаридів, органічних і гідроксикоричних кислот [1, 5, 13]. Надзвичайно

важливу роль відіграють індольні та сірковмісні сполуки брокколі: глюкозинолати, ізотіоціанати, сірковмісні глікозиди тощо.

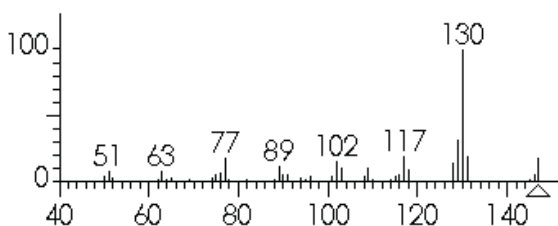
Однією з важливих властивостей, що характеризує біологічну активність глюкозинолатів брокколі, а також продуктів їх ферментативного гідролізу — ізотіоціанатів, є їх здатність інгібувати вільні радикали, які утворюються при різних патологічних станах людського організму. Це різного роду запалення, радіаційне ураження, алкоголізм, ішемічна хвороба серця, рак, процеси старіння. Відомо, що ізотіоціанати та індольні сполуки брокколі, які мають антиоксидантні властивості, ефективно зв'язують вільні радикали (у тому числі такі, що утворюються під впливом іонізуючого випромінювання),

Рисунок 1



Мас-спектр l-сульфорафану

Рисунок 2



Мас-спектр індол-3-карбінолу

активують процеси взаємодії білків їжі із травними ферментами, покращують всмоктування пептидів і амінокислот, прискорюють процеси етерифікації жирних кислот і холестерину, запобігаючи тим самим розвитку атеросклерозу та ішемічної хвороби серця [5, 6, 8, 9, 12].

Метою даної роботи було вивчення сірковмісних сполук капусти брокколі за допомогою сучасного методу дослідження — газової хромато-мас-спектрометрії (ГХМС).

Матеріали та методи

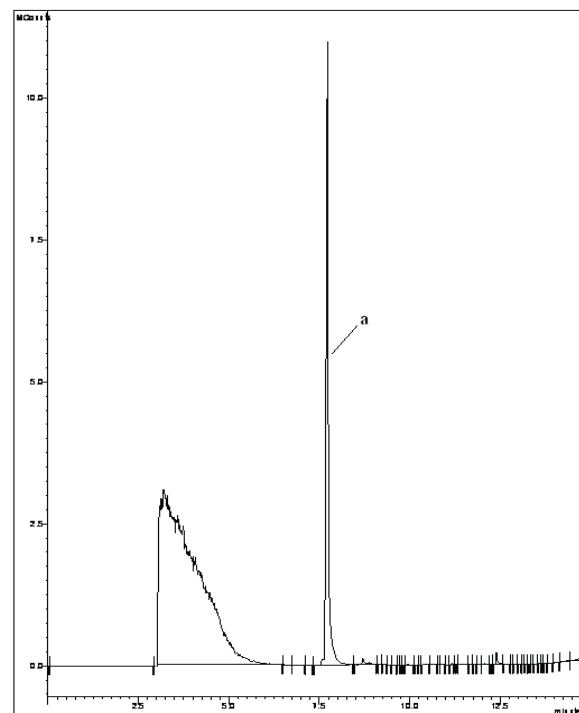
Об'єктами дослідження були трава брокколі та біологічно активна рідина зі свіжої трави брокколі, отримана вакуумно-конденсаційним методом за таких умов: тиск (1.0-6.6) Мпа і температура (36-37) °С.

Для дослідження БАР брокколі використовували метод ГХМС, що поєднує метод розділення складних сумішей - хроматографію з одним із найбільш інформативних методів встановлення структури органічних сполук — мас-спектроскопією. Застосування цього методу дозволяє проводити ідентифікацію невивчених речовин без використання мітчиків цих речовин за бібліотечними мас-спектрами [10, 11, 14].

Дослідження якісного складу БАР трави брокколі та біологічно активної рідини проводили методом парофазного аналізу проби за таких умов:

- колонка: капілярна кварцова, розміром 30 м × 0.25 мм ID із нанесеним шаром нерухомої фази — 5% феніл — 95% диметилполісилоксану

Рисунок 3



Хроматограма l-сульфорафану

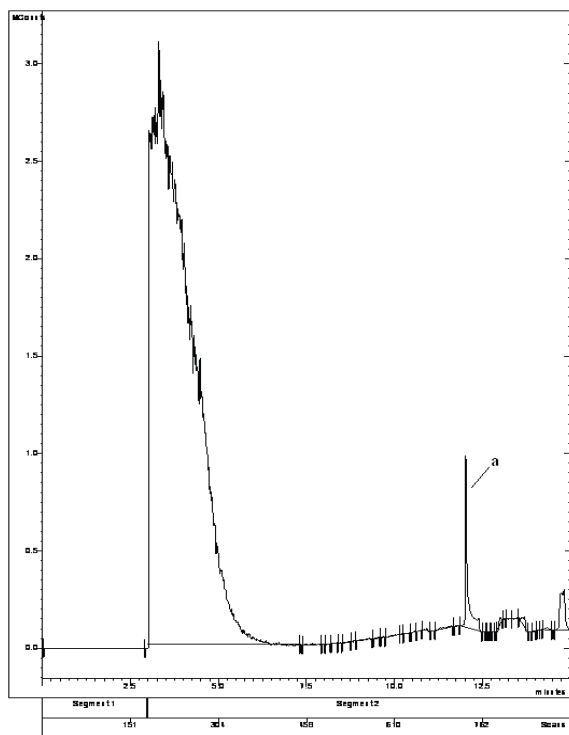
товщиною 0.25 мкм (CP-SIL8, CHROMPACK) або аналогічна, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;

- температуру термостата колонки програмували: від 40 °С (затримка 5 хв) до 250 °С (затримка 10 хв), швидкість підвищення температури — 10 °С/хв;
- температура блоку випарника — 200 °С;
- настройки мас-детектора: діапазон сканування мас — 40-650; затримка — 1 хв; режим іонізації — електронний удар (70 eV);
- швидкість газу-носія (гелій) 0.5 мл/хв;
- об'єм проби 1 мкл.

Методика пробопідготовки відповідно до [3].

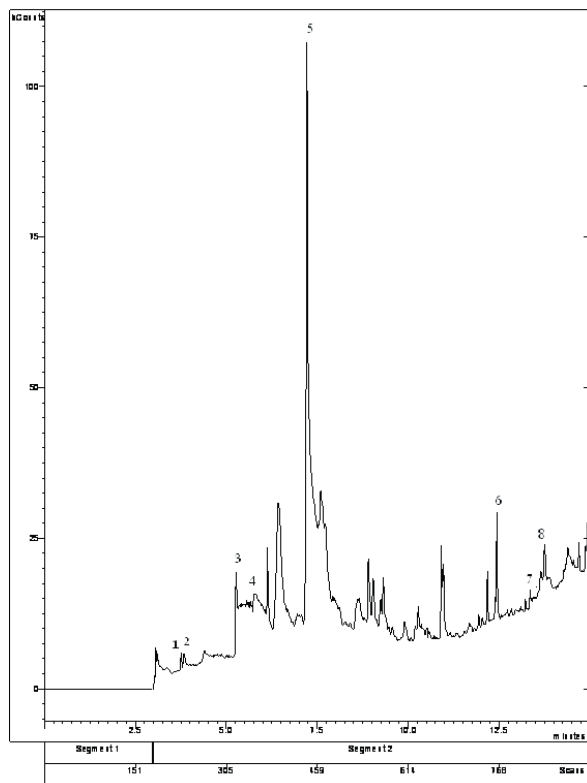
За літературними даними відомо, що брокколі містить такі основні діючі речовини, як сульфорафан та індол-3-карбінол, тому основним завданням нашої роботи було встановлення саме цих речовин. Для дослідження використовували біологічно активну рідину та водний екстракт із трави брокколі, отриманий методом мацерації повітряно-сухої сировини холодною водою протягом 17 год. Такі умови необхідні для протікання ферментативного гідролізу глюकोзинолатів під дією ферменту рослини мірозинази, тому що саме під дією мірозинази глюकोзинолат глюкорафанін утворює сульфорафан [10, 14].

Рисунок 4



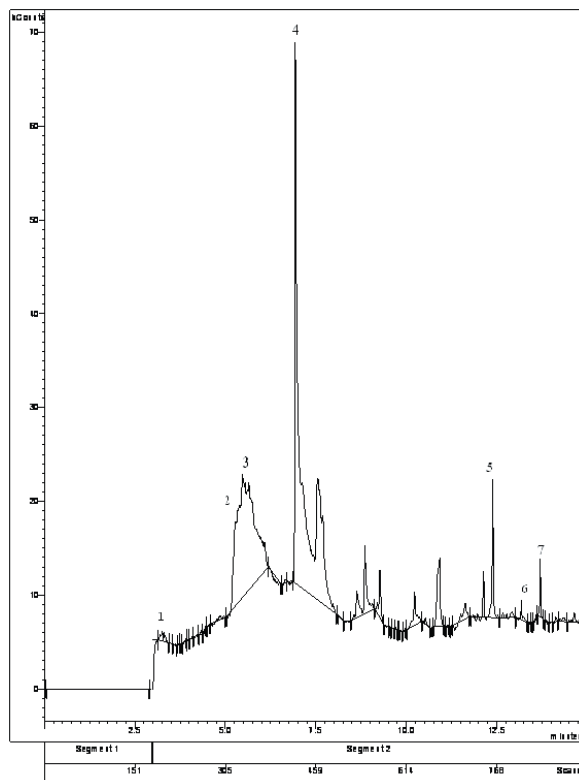
Хроматограма індол-3-карбінолу

Рисунок 5



Хроматограма водного екстракту брокколі

Рисунок 6



Хроматограма біологічно активної рідини брокколі

Для ідентифікації речовин використовували мітчики сульфорафану (S6317 1-Sulforaphane) та індол-3-карбінолу (17256 indole-3-carbinol) («Sigma-Aldrich»), мас-спектри яких наведено на Рис. 1 та Рис. 2, а хроматограми — на Рис. 3 і Рис. 4, відповідно. Для встановлення структури інших сполук використовували бібліотеку стандартних спектрів NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Version 1.7.

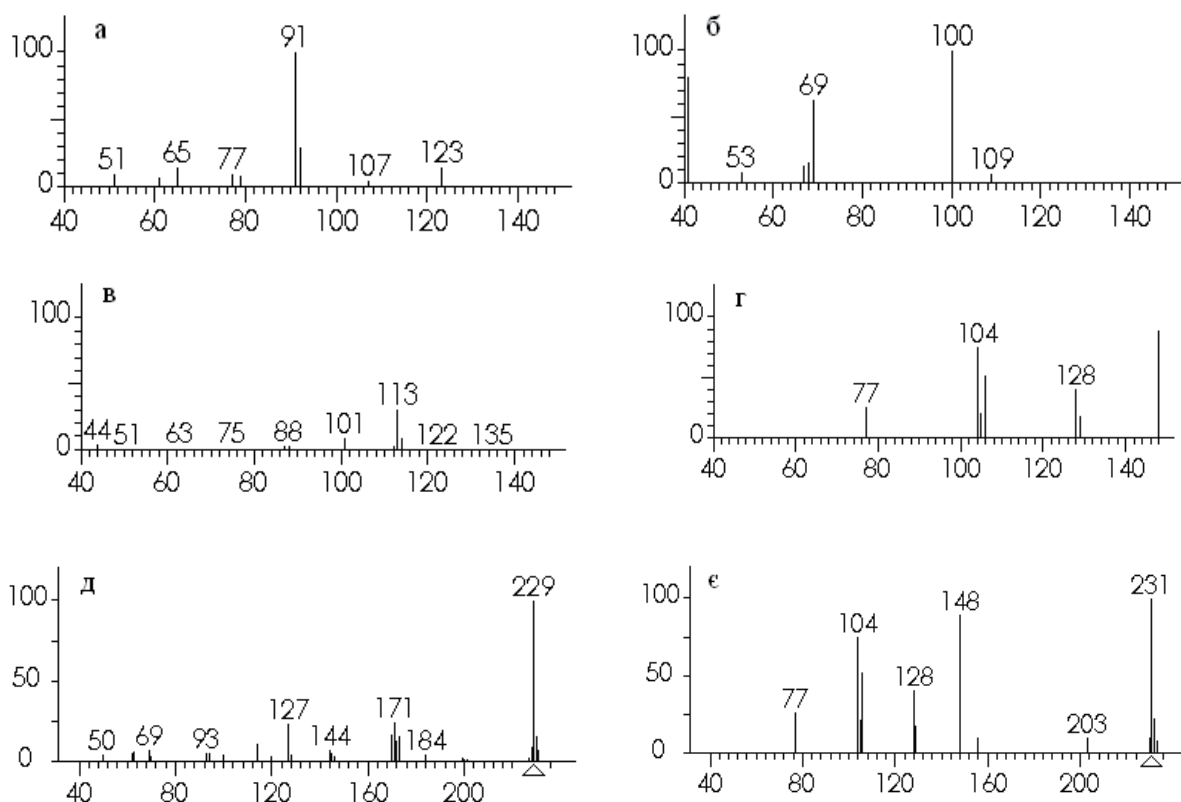
Для одержання мас-спектрів був використаний режим іонізації «електронний удар», тому молекули вихідних речовин були достатньо сильно дефрагментовані, ідентифікацію проводили за осколковими іонами і за часом утримування піків мітчиків та сполук екстракту.

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз хроматограм, наведених на Рис. 5 і Рис. 6, та мас-спектрів основних компонентів, наведених на Рис. 7 і Рис. 8, свідчить, що при використанні капілярної колонки із 5% феніл — 95% диметилполісилоксаном спостерігається чітке розділення багатьох компонентів брокколі — хроматограма містить більше 30 піків, що виходять із колонки протягом 15 хв.

Порівняння часів утримування сульфорафану та похідного індолу — індол-3-карбінолу із часом утримування відповідних піків на хро-

Рисунок 7



Хромато-мас-спектри ідентифікованих речовин у траві брокколі

матограмі водного екстракту із трави брокколі (Рис. 5) та на хроматограмі біологічно активної рідини (Рис. 6), а також аналіз отриманих мас-спектрів свідчив, що ці сполуки містяться у зразках брокколі. У результаті дослідження за допомогою даних бібліотечних спектрів також встановлено, що трава та біологічно ак-

тивна рідина брокколі містить різні сульфо- й амінопохідні.

У результаті дослідження у траві брокколі ідентифіковано та встановлено структуру 8 сполук, із яких - 1 меркаптосполука, 1 похідне індолу, 1 похідне сесквітерпеноїду типу гвайану, 1 похідне аліфатичної кислоти та 4 алкілізотіоціанати (Табл. 1).

Таблиця 1

Результати визначення компонентів у траві брокколі

Номер піка на хроматограмі	Час утримування, хв	Молекулярний іон, M^+	Загальна формула	Ідентифікований компонент
1	3.9	M^+ 91	$C_{10}H_{12}O_2S$	пропіонова кислота, 3-меркапто бензиловий ефір (Рис. 7а)
2	4.3	M^+ 100	$C_{10}H_{16}O_2$	2,6-нонадієнова кислота, метиловий ефір (Рис. 7б)
3	5.7	M^+ 113	C_5H_8NS	бут-3-єніл-ізотіоціанат (Рис. 7в)
4	6.1	M^+ 128	$C_{10}H_8$	азулен (Рис. 7г)
5	7.2	M^+ 177	$C_6H_{11}NOS_2$	4-метилсульфінілбутил ізотіоціанат (Рис. 3)
6	12.5	M^+ 130	C_9H_9NO	3-гідроксиметиліндол (індол-3-карбінол) (Рис. 4)
7	13.4	M^+ 229	$C_{11}H_{21}NO_2S_2$	9-метилсульфоніл ізотіоціанат (Рис. 7д)
8	14.2	M^+ 231	$C_{11}H_{21}NS_2$	9-метилтіонолілізотіоціанат (рис. 7е)

Таблиця 2

Осколкові іони, що утворюються при електронному ударі речовини *a* у траві брокколі, та їх інтенсивність (у дужках)

Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)
27 (130)	65 (160)	92 (300)
39 (110)	77 (100)	107 (60)
51 (110)	79 (90)	123 (160)
61 (80)	91 (999)	196 (30)

Таблиця 3

Осколкові іони, що утворюються при електронному ударі речовини *b* у траві брокколі, та їх інтенсивність (у дужках)

Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)
41 (810)	68 (170)	109 (80)
53 (90)	69 (640)	168 (15)
67 (140)	100 (999)	

Таблиця 4

Осколкові іони, що утворюються при електронному ударі речовини *e* у траві брокколі, та їх інтенсивність (у дужках)

Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)
12 (7)	85 (2)	177 (1)
16 (10)	99 (23)	185 (1)
17 (7)	106 (2)	198 (11)
20 (2)	113 (999)	202 (16)
26 (3)	120 (1)	213 (5)
33 (1)	134 (3)	223 (15)
39 (13)	149 (3)	228 (313)
47 (1)	157 (1)	232 (1)
58 (1)	163 (6)	235 (1)
65 (1)	169 (1)	237 (2)
73 (1)	172 (1)	243 (1)

Таблиця 5

Осколкові іони, що утворюються при електронному ударі речовини *z* у траві брокколі, та їх інтенсивність (у дужках)

Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)
26 (9)	64 (89)	111 (1)
30 (1)	72 (1)	113 (1)
37 (10)	77 (56)	122 (2)
43 (2)	85 (6)	125 (5)
49 (8)	87 (20)	128 (999)
154 (1)	97 (3)	129 (104)
160 (1)	100 (8)	130 (5)

У Табл. 2-7 наведено молекулярні іони (та їх інтенсивності у відсотках), що утворювались дією «електронного удару» при проведенні аналізу. У подальшому отримані молекулярні іони порівнювались із відповідними іонами у бібліотечних зразках і проводилась ідентифікація речовин.

У біологічно активній рідині брокколі ідентифіковано та встановлено структуру 1 похідного індолу та 6 сірковмісних сполук, із яких — 1 меркаптосполука та 5 ізотіоціанатів: 4 алкілізотіоціанати та 1 арілізотіоціанат (Табл. 8).

Речовини *a*, *b*, *r* та *g* у біологічно активній рідині брокколі аналогічні речовинам *a*, *v*, *ж* і *з*

Таблиця 6

Осколкові іони, що утворюються при електронному ударі речовини δ у траві брокколі, та їх інтенсивність (у дужках)

Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)
50 (51)	127 (239)	184 (49)
62 (61)	128 (50)	199 (29)
63 (68)	144 (79)	200 (20)
69 (81)	145 (60)	201 (20)
70 (39)	146 (40)	227 (30)
93 (60)	159 (19)	228 (98)
94 (59)	170 (178)	229 (999)
100 (50)	171 (248)	230 (168)
114 (118)	172 (140)	230 (78)
120 (40)	173 (168)	

Таблиця 7

Осколкові іони, що утворюються при електронному ударі речовини ϵ у траві брокколі, та їх інтенсивність (у дужках)

Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)
77 (270)	129 (190)	231 (999)
104 (760)	148 (900)	322 (230)
105 (220)	156 (110)	233 (90)
106 (530)	203 (110)	
128 (410)	230 (110)	

Таблиця 8

Результати визначення компонентів у біологічно активній рідині брокколі

Номер піка на хроматограмі	Час утримування, хв	Молекулярний іон, M^+	Загальна формула	Ідентифікований компонент
1	3.9	M^+ 91	$C_{10}H_{12}O_2S$	пропіонова кислота, 3-меркапто-бензиловий ефір (Рис. 7а)
2	5.7	M^+ 113	C_5H_8NS	бут-3-еніл-ізотіоціанат (Рис. 7б)
3	5.9	M^+ 118	$C_8H_{13}N$	фенілацетонітрил (Рис. 8 в)
4	7.2	M^+ 177	$C_6H_{11}NOS_2$	4-метилсульфінілбутил ізотіоціанат (Рис. 3)
5	12.5	M^+ 130	C_9H_9NO	3-гідроксиметиліндол (індол-3-карбінол) (Рис. 4)
6	12.7	M^+ 135	$C_8H_{16}NS$	окт-7-еніл-ізотіоціанат (Рис. 8ж)
7	13.1	M^+ 169	$C_9H_{19}NO_2S$	8-метилсульфонілоктил ізотіоціанат (Рис. 8з)

Таблиця 9

Осколкові іони, що утворюються при електронному ударі речовини ϵ у біологічно активній рідині брокколі, та їх інтенсивність (у дужках)

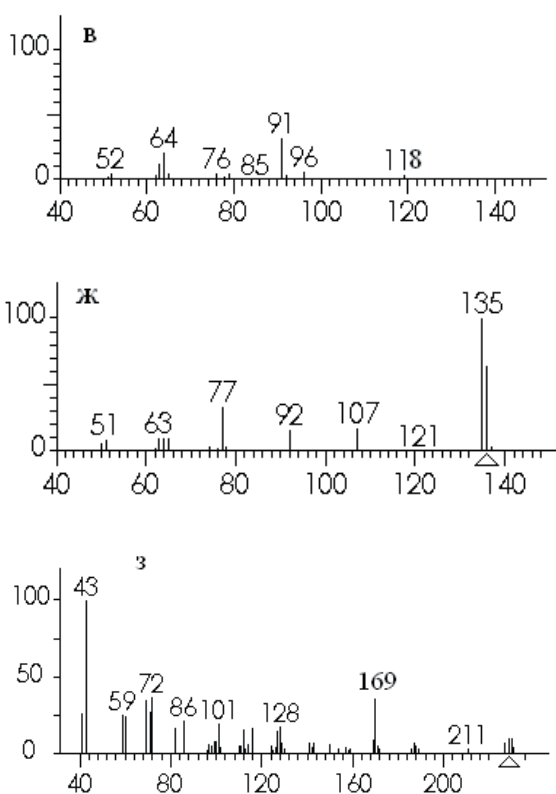
Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)
91 (60)	105 (351)	196 (338)
103 (59)	118 (999)	203 (39)
104 (90)	132 (45)	267 (40)

у траві брокколі. У табл. 9-11 наведено молекулярні іони (та їх інтенсивність у відсотках), що утворювались дією «електронного удару» при проведенні аналізу, а на Рис. 8 — мас-спектри

нових речовин, що були встановлені у біологічно активній рідині брокколі.

Отримані дані ГХМС вивчення БАР біологічно активної рідини брокколі свідчать, що за-

Рисунок 8



Хромато-мас-спектри ідентифікованих речовин у біологічно активній рідині брокколі

пропонована технологія отримання біологічно активної рідини забезпечує майже повну екстракцію БАР. Крім того, за допомогою методу ГХМС можна встановити так звані речовини-маркери, що характерні для родини *Brassicaceae*, представником якої є брокколі, із метою розробки сучасних методик вивчення сірковмісних сполук родини капустяних.

Висновки

Методом ГХМС у траві капусти брокколі встановлено структуру 8 речовин: 4 ізотіоціанати, включаючи сульфорафан, 1 сесквітерпеноїд типу гвайану, 1 похідне аліфатичної кислоти, 1 меркаптосполука та 1 похідне індолу – індол-3 карбінол.

Методом ГХМС у біологічно активній рідині брокколі встановлено структуру 7 сполук: 1 похідного індолу та 6 сірковмісних речовин, із яких - 1 меркаптосполука та 5 ізотіоціанатів: 4 алкілтіоціанати та 1 арилтіоціанат.

Отримані у такому обсязі дані експерименту є новими (в Україні такі дослідження проведено вперше), доповнюють відомості про хімічний склад капусти брокколі та можуть бути використані при розробці методик стандартизації сировини та отриманих субстанцій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Владимирова І.М. Порівняльне фармакогностичне дослідження брокколі сортів Тонус, Калабрайзе, Вітамінна /

Таблиця 10

Осколкові іони, що утворюються при електронному ударі речовини *ж* у біологічно активній рідині брокколі, та їх інтенсивність (у дужках)

Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)
41 (500)	119 (250)	209 (80)
55 (400)	128 (130)	221 (50)
65 (320)	135 (999)	267 (530)
73 (230)	145 (130)	269 (550)
91 (135)	171 (50)	315 (10)
106 (170)	189 (40)	358 (10)
115 (180)	193 (50)	360 (10)

Таблиця 11

Осколкові іони, що утворюються при електронному ударі речовини *з* у біологічно активній рідині брокколі, та їх інтенсивність (у дужках)

Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)	Молекулярний іон (інтенсивність, %)
41 (269)	110 (60)	169 (999)
59 (260)	116 (179)	172 (40)
69 (357)	126 (50)	187 (350)
72 (377)	130 (40)	211 (40)
86 (221)	143 (79)	227 (80)
97 (68)	150 (69)	229 (699)
100 (88)	159 (40)	231 (49)

- І.М. Владимірова, В.С. Кисличенко // Ліки і життя 2007: Фармакотерапія та розробка лікарських засобів: Міжнар. мед.-фармац. конг., 6-9 лютого 2007 року. — К., 2007. — С.90.
2. Гринь В.П. Капуста брокколи // Дім, сад, город. — 2004. — № 9. — С. 8.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 1. — Харків: РІРЕГ, 2004. — 520 с.
4. Кисличенко В.С. Капуста брокколи — незамінний харчовий продукт дієтопрофілактики раку / В.С. Кисличенко, І.М. Владимірова, О.О. Махотіна // Віддалені наслідки впливу іонізуючого випромінювання: Тез. доп. міжнар. наук.-практ. конф., 23-25 травня 2007 року. — К.: ЗАТ «НІЧЛАВА», 2007. — С.283-284.
5. Кисличенко В.С. Перспективність розробки біологічно активної добавки — спеціального пищевого продукту на основі капусти брокколи (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) / В.С. Кисличенко, І.Н. Владимірова, О.А. Махотіна // Фитофарм 2006: Актуальні проблеми створення нових лікарських препаратів рослинного походження: X Міжнарод. съезд, 27-30 июня 2006 года. — СПб., 2006. — С.127-132.
6. Лівенцев В. Ця дивовижна капуста брокколи: дослідженням встановлено її протипухлинну дію // Сад, виноград і вино України. — 2002. — № 3/4. — С. 43.
7. Смілянець М.Н. Брокколи — еліксир молодості // Дім, сад, город. — 2001. — № 3. — С. 4-5.
8. Balch J.F. Prescription for Nutritional healing / J.F. Balch, P.A. Balch. — 2nd ed. — New York: Avery Publishing Group, 1997. — 600 p.
9. Dashwood R.H. Indole-3-carbinol: Anticancerogen or tumor promoter in brassica vegetables? // Chem.-Biol. Interact. — 1998. — Vol. 110, № 1-2. — P. 1-5.
10. Heaney R. K. The analysis of glucosinolates in *Brassica* species using gas chromatography. Direct determination of thiocyanate ion precursors, glucobrassicin and neoglucobrassicin / R.K. Heaney, G.R. Fenwick // J. Sci. Food Agric. — 1980. — Vol. 31, № 6. — P. 593-599.
11. McGregor I. Determination of glucosinolates in brassica seed. *Eucarpia* Cruciferae // Newsl. — 1985. — Vol. 10, № 2. — P. 132-136.
12. Mithen R.F. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods / R.F. Mithen, M. Dekker, R.J. Verkerk // Sci. Food Agric. — 2000. — № 80. — P. 967-984.
13. Sezik E. Traditional medicine in Turkey: Folk medicine in Central Anatolia // Journal of Ethnopharmacology. — 2001. — Vol. 75, № 1. — P. 95-115.
14. Spinks E. A. The quantitative analysis of glucosinolates in cruciferous vegetables, oilseeds and forage crops using high performance liquid chromatography / E.A. Spinks, K. Stones, G.R. Fenwick // Fette Seifen Anstrichm. — 1984. — Bd. 86, № 3. — P. 228-231.

Резюме

Ханін В.А., Владимірова І.Н., Кисличенко В.С.

Изучение биологически активных веществ брокколи методом хромато-масс-спектрометрии

Методом газової хромато-масс-спектрометрії в траві капусти брокколи ідентифіковані та встановлена структура 8 речовин, з яких - 1 меркаптосоединение, 1 производное индола, 1 производное сесквитерпеноида типа гваяна, 1 производное алифатической кислоты и 4 алкилизотиоцианата; в біологічно активній рідинці брокколи — 1 производное индола и 6 серосодержащих соединений, из которых - 1 меркаптосоединение и 5 изотиоцианатов: 4 алкилизотиоцианата и 1 арилизотиоцианат.

Summary

Khanin V.A., Vladimirova I.N., Kislichenko V.S.

Study of biologically active substances of broccoli with the use of chromatography-mass spectrometry

With the use of chromatography-mass spectrometry in broccoli herb have been identified and determined structures of 8 compounds: 1 was mercapto compound, 1 was indol derivative, 1 was derivative of seskiterpenoid of gwayan type, 1 was derivative of aliphatic acid and 4 were alkylisothiocyanates; in broccoli biologically active liquid have been identified and determined 1 indol derivative and 6 sulfur compounds: 1 was mercapto compound and 5 were arylisothiocyanates (4 were alkylisothiocyanates and 1 was arylisothiocyanates).

Ханін Вадим Андрійович. К.х.н. Зав. лабораторії фізико-хімічних методів аналізу ТОВ «ФК «Здоров'я».

Владимірова Інна Миколаївна. К.фарм.н. Асистент кафедри якості, стандартизації та сертифікації ліків Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації НФаУ.

Кисличенко Вікторія Сергіївна. Д.фарм.н. Професор. Зав. кафедри хімії природних сполук НФаУ.

УДК 543.544.45:582.949.27

Попова Н.В., Литвиненко В.И.
 Национальный фармацевтический университет
 Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Анализ эфирного масла мелиссы лекарственной

Приведен литературный обзор изучения компонентного состава и количественного содержания эфирного масла мелиссы. Проанализованы различные серии эфирного масла мелиссы (метод ТСХ). Анализ методом газовой хроматографии показал, что эфирное масло мелиссы содержит 22 компонента, основными из которых являются цитронеллаль, гераниол и цитронеллол.

Мелисса лекарственная (лимонная мята) *Melissa officinalis* L., сем. яснотковые *Lamiaceae* — одно из популярных ароматических лекарственных растений. Биологическая активность мелиссы обусловлена суммой веществ, в том числе эфирным маслом, локализованным в эфирномасличных железках, и фенольными соединениями, в том числе производными гидроксикоричных кислот и флавоноидами. Из эфирного масла растения были выделены цитраль и цитронеллаль, придающие мелиссе приятный лимонный запах, а также гераниол, линалоол и цитронеллол. [1, 2, 7]. Выход и состав эфирного масла мелиссы лекарственной зависят от места произрастания, времени заготовки, метода сушки и других факторов. Ком-

понентный состав эфирного масла мелиссы из различных источников представлен в Табл. 1 [9, 10, 11, 12].

Экспериментальные данные свидетельствуют, что как компонентный состав, так и количественное содержание компонентов в образцах мелиссы из различных регионов значительно варьируют. Выход масла в исследуемых образцах колеблется от 0.036 % до 0.14 % [9-12].

Для применения в медицине Европейская Фармакопея рекомендует использовать лист мелиссы лекарственной, в то время как отечественная ФС регламентирует качество травы мелиссы. Следует отметить, что ряд зарубежных фармакопей качество сырья мелиссы анализируют в пересчете на содержание эфирного

Таблица 1

Компонентный состав эфирного масла мелиссы лекарственной (на основе литературных данных)

Компонент эфирного масла	Содержание, %			
	[9]	[10]	[11]	[12]
цитронеллаль	*	отсутствует	3.71	1.88 — 10.03
мууролен	2.81 — 2.94	*	*	*
этанопентанол	1.36- 1.24	*	*	*
β-кариофиллен	26.80-28.38	7.2-15.3	7.38	*
α- карофиллен	*	*	0.53	*
β-сесквифелландрен	1.87 — 2.19	*	*	*
кариофиллен-оксид	8.65- 9.05	12.6-24.4	2.29	*
циклогексанол	0.95- 1.27	*	*	*
гермакрен	27.42- 27.24	*	*	*
гермакрен-4-ол	2.04- 1.89	*	*	*
циклогермакрен	6.94 — 7.69	*	*	*
нераль (цитраль а)	0.24 -0.21	отсутствует	3.16	4.28 — 26.61
гераниаль (цитраль в)	0.39- 0.41	*	3.91	4.52 — 58.64
гераниол	*	*	48.23	1.88- 23.22
β-пинен	*	6.4-18.2	0.26	1.50 — 44.49
α- пинен	*	*	*	1.33 — 11.38
β- мирцен	*	*	0.58	*
сабинен	*	6.9-17.4	*	*
β-фарнезен	*	*	0.43	*
азулен	*	*	0.48	*
линалоол	*	*	*	0.40- 9.00

Примечание.

* — данные отсутствуют.

масла. Так, Фармакопея Германии регламентирует содержания не менее 0.05 % эфирного масла. [14]. Европейская Фармакопея подлинность листа мелиссы определяет с помощью тонкослойной хроматографии с идентификацией цитраля и цитронеллала на хроматографической пластинке [3]. В ФС 42-3645-98 раздел химической идентификации отсутствует.

Целью настоящего исследования является идентификация отечественных образцов листа мелиссы по эфирному маслу в соответствии с требованиями ЕФ [3, 5, 6].

Экспериментальная часть

Эфирное масло мелиссы получали из листа мелиссы (серии 91008, 10108 и 51007 ЗАТ «Лектравы», г. Житомир) методом гидроdistилляции в соответствии с [8]. Выход масла составил 0.01 %.

Для хроматографического анализа 50 мкг полученного эфирного масла растворяли в 2 мл ксилена. Для получения раствора сравнения растворяли 1.0 мкл цитронеллала и 10.0 мкл цитраля в 25 мл ксилена. На хроматографическую пластинку (Silicagel 60F₂₃₄, фирма «Merck») наносили полосами по 10 мкл каждого раствора. Хроматографирование (15 см) проводили в камере с системой растворителей этилацетат — гексан (10:90). Пластинку высушивали на воздухе и проявляли раствором анисового альдегида или 10 % раствором фосфорно-молибденовой кислоты, или ванилин-серным реактивом, далее ее нагревали при температуре 105 °С в течение (10-15) мин. [3, 5, 8, 13]. На хроматограмме раствора сравнения обнаруживаются две полосы, соответствующие цитралю и цитронеллалу. Хроматографический анализ всех образцов эфирного масла показал несколько основных пятен, одно из которых совпадало с цитронеллалем, а пятно, соответствующее цитралю, показало следовые количества во всех исследуемых образцах. То есть основным компонентом полученного масла является цитронеллаль (Рис. 1).

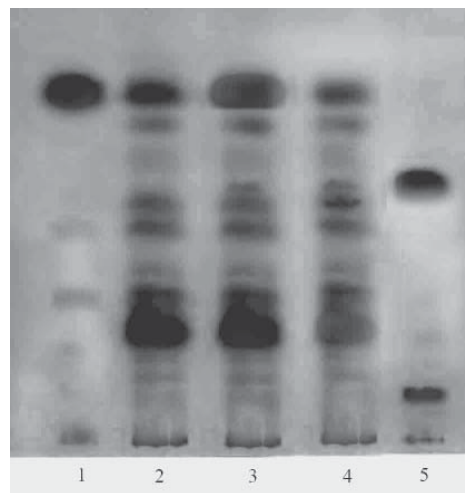
Исследование компонентного состава эфирного масла мелиссы промышленной заготовки проводили методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с масс-детектированием. Исследования проводили на газовом хромато-масс-спектрографе фирмы «Хьюлет Паккард» (НР), США. Компоненты разделяли на кварцевой капиллярной колонке фирмы НР (НР 190911J-433 НР-5) длиной 30 м и внутренним диаметром 0.25 мм, заполненной 5 % фенилметилсилоксаном. Температура колонки: начальная температура 60 °С, конечная 240 °С. Продолжительность разгонки (от начального до конечного

изотермичного участка температурной программы) 1 час. Скорость повышения температуры 3 °С/мин. Объем пробы 0.3 мкл, деление потока 1:15, давление на входе в колонку 40кПа, газ-носитель — гелий. Сканирование проводилось в диапазоне (38-300) а.е.м.

Результаты исследований и их обсуждение

Полученные спектры рассматривали как на основе общих закономерностей фрагментации молекул органических веществ под действием электронного удара, так и путем поиска в масс-спектральной библиотеке баз данных «Flavor 2.L.» и «NIST98L.». Перед проведением поиска для каждого хроматографического пика рассчитывали усредненный масс-спектр, от которого отнимали спектр фона. Схема хроматограммы терпеноидов эфирного масла мелиссы лекарственной приведена на Рис. 2.

Рисунок 1

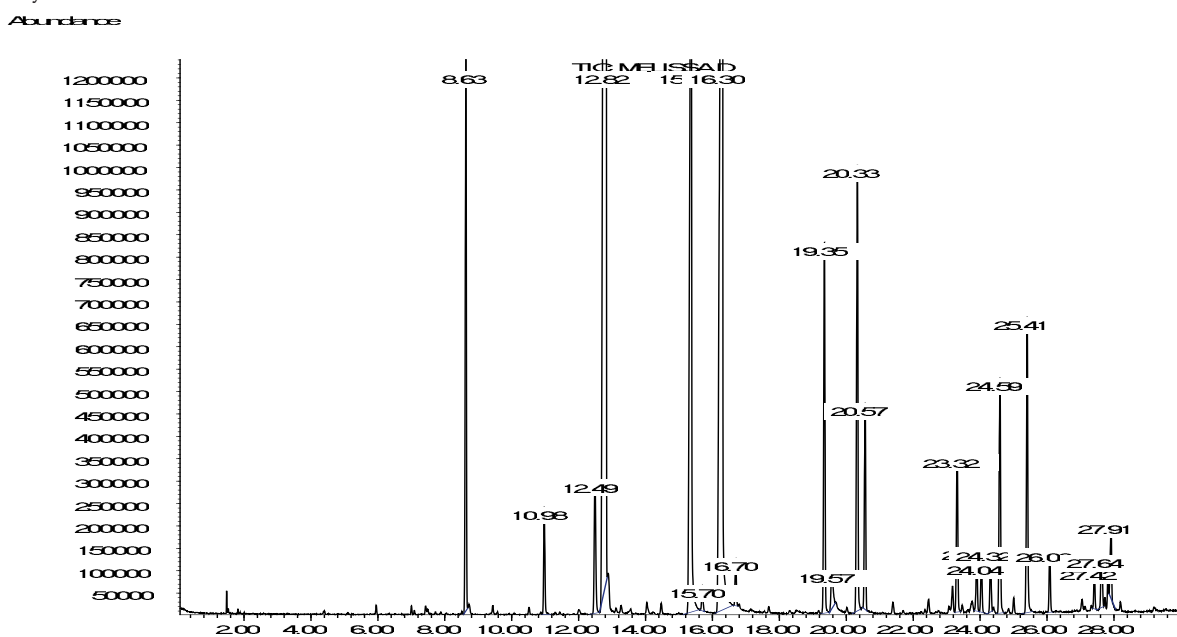


- 1 — раствор цитронеллала,
2, 3, 4 — образцы масел мелиссы лекарственной (серии 91008, 10108 и 51007, соответственно),
5 — раствор цитраля.

Хроматограмма эфирного масла мелиссы лекарственной

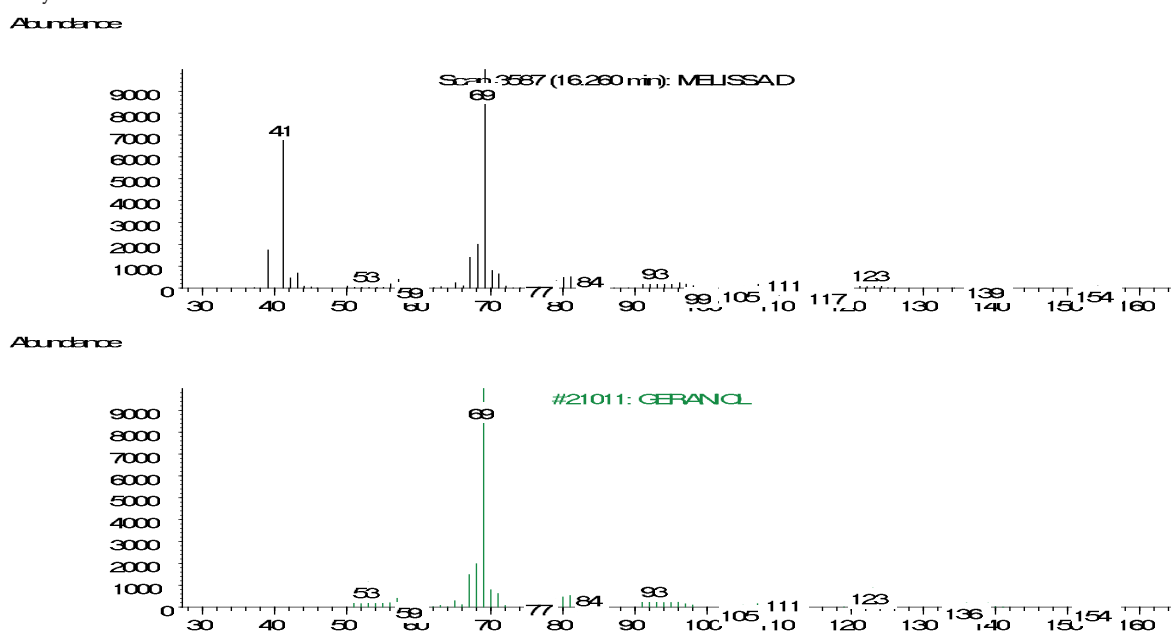
Идентификацию веществ проводили путем сравнения полученных масс-спектров хроматографического пика с масс-спектром эталонных веществ, с наибольшей вероятностью идентифицированных программой распознавания из массива спектров базы данных. Количественное содержание рассчитывали по отношению площади пиков компонентов к сумме площадей всех пиков на хроматограмме (метод нормализации). Пример масс-спектра ряда идентифицированного вещества представлен на Рис. 3. Результаты исследования компонентного состава эфирного масла мелиссы представлены в Табл. 2.

Рисунок 2



Хроматограмма терпеноидов эфирного масла мяты лекарственной

Рисунок 3



Масс-спектр исследованного гераниола и масс-спектр гераниола - стандарта

В результате анализа эфирного масла мяты лекарственной идентифицировано 22 терпеноида, большинство из которых относят к монотерпеноидам (лимонен, линалоол, изопулегол, цитронеллаль, цитронеллол, нераль, гераниол, гераниаль, цитронеллилацетат), ароматическим соединениям (эвгенол), сесквитерпеноидам (β -элемен, гермакрен D, α -мууролен, гермакрен A, γ -кадинен, D-кадинен, элемол, эндобурбонанол, γ -эвдесмол, эпи- γ -мууроол,

α -кадинол).

В количественном соотношении доминирующими компонентами эфирного масла являются цитронелаль, цитронеллол, гераниол. Следует отметить, что во многих зарубежных источниках, в том числе в Европейской Фармакопее во многих образцах отмечает достаточно высокий уровень цитраля ((5.82 – 33.3) %), в то время как в исследуемом образце – следовые количества. [9, 10, 11, 12].

Таблица 2

Компонентный состав эфирного масла Melissa лекарственной (на основе собственных экспериментальных данных)

Компонент эфирного масла	Содержание, %
лимонен	4.61
линалоол	1.02
изопулегол	1.56
цитронеллаль	35.24
цитронеллол	11.97
нераль	0.27
гераниол	22.25
гераниаль	0.46
цитронеллиацетат	3.76
эвгенол	0.59
геранилацетат	4.66
β -элемен	2.08
гермакрен D	1.67
α -мууролен	0.64
гермакрен A	0.51
γ -кадинен	0.61
D-кадинен	2.57
элеомл	3.07
эндобурбонанол	0.59
γ -эвдесмол	0.35
эпи- γ -мууроол	0.64
α -кадинол	0.76

Выводы

1. В эфирном масле Melissa идентифицировано 22 терпеноида, установлено их количественное содержание. Листья Melissa лекарственной, представленные на рынке Украины, отличаются от европейских образцов содержанием следовых количеств цитраля и высоким содержанием цитронеллала, гераниола и цитронеллола.

2. Анализируемые отечественные образцы листьев Melissa лекарственной по разделу «Идентификация» соответствуют требованиям ЕФ, поэтому метод ТСХ для идентификации листьев Melissa может быть предложен для включения в проект монографии ГФУ на листья Melissa.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зузук Б.М., Куцик Р.В. Melissa лекарственная (*Melissa officinalis* L.). Аналитический обзор // Провизор. - 2002. - № 2. - С. 21-25.
2. Зузук Б. М., Куцик Р.В. Melissa лекарственная (*Melissa officinalis* L.) // Провизор. - 2002. - №.1. - С. 36-39.
3. European Pharmacopoeia — 5th ed.- Strasbourg: Council of Europe, 2006.
4. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия: Учебное пособие / Под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой - Спб.: Спецлит, 2004 - 765 с.

5. Wichtl M., Bisset N.G. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. - Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1994. — 566 p.

6. Проблемы введения монографий на лекарственное растительное сырье в Государственную Фармакопею Украины / Гризодуб А.И., Георгиевский Г.В., Тихоненко Т.М., Георгиевский В.П. // Фармаком. - 2004. - № 4. - С. 3-17.

7. Bagdat R.B., Co ge B. The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields // J. of Fac. of Agric. — 2006. - № 21(1). - P. 116-121.

8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково – експертний фармакопейний центр». - 1-е вид.- Харків: PIPEГ, 2001. - Доповнення 1. - 2004. - 520 с.

9. Ayanoglu F., Arslan M., Hatay A. Effects of Harvesting Stages, Harvesting Hours and Drying Methods on Essential Oil Content of Lemon Balm Grown in Eastern Mediterranean // International Journal of Botany. — 2005. - № 1 (2). - P. 138-142.

10. Basta A., Tzakou O., Couladis M. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* s // Greece Flavour and Fragrance Journal. — 2005. - Vol. 20, № 6. - P. 642-644.

11. Химический состав эфирного масла Melissa лекарственной Красноярского края / Степаненко Л.В., Шаталова Н.В., Слащинин Г.Д., Ефремов А.А. // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Материалы III Всероссийской конференции. - Барнаул, 2007. - Т. 2. - С. 128-132.

12. Sari A.O., Ceylan A. Yield characteristics and essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in the Aegean region of Turkey // Turk J Agric For. — 2002. - № 26. - P. 217 – 224.

13. Wagner H., Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer Chromatography Atlas. — 2nd ed.- Berlin: Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1995. — 384 p.

14. Deutsches Arzneibuch. - Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2002.

Резюме

Попова Н.В., Литвиненко В.І.

Аналіз ефірної олії меліси лікарської

Наведено літературний огляд кількісного вмісту та компонентного складу ефірної олії меліси. Проаналізовано різні серії ефірної олії меліси (метод ТШХ). Аналіз методом газової хроматографії показав, що ефірна олія містить 22 компонента, основними з яких є цитронелаль, гераніол і цитронеллол.

Summary

Popova N.V., Litvinenko V.I.

Analysis of *Melissa officinalis* L. essential oil

A review of composition of lemon balm essential oil study was given. TLC analysis of essential oil of melissa of different series were conducted. HPLC of the melissa essential oil showed the content of 22 terpenoids, the dominant of which were citronellal, geraniol, citronellol.

Попова Наталия Вячеславовна. Окончила Харьковский фармацевтический институт (1981). Доцент кафедры фармакогнозии Национального фармацевтического университета.

Литвиненко Василий Иванович. Окончил Харьковский фармацевтический институт (1959). Д.х.н. Профессор. Академик ИА Украины. Зав. сектором химии и технологии фенольных препаратов ГП ГНЦАС.

УДК 582.972.3:547.466

Ільїна Т.В., Горяча О.В., Ковальова А.М., Андрусенко О.В., Комісаренко А.М.
Національний фармацевтичний університет

Амінокислотний склад кореневищ із коренями та трави *Galium verum L.*

Вивчено якісний склад суми амінокислот у кореневищах із коренями і трави *Galium verum L.* Виявлено 15 амінокислот, у тому числі 9 незамінних. Встановлено, що вміст суми амінокислот у кореневищах із коренями становить 6.426 %, у траві – 5.433 %. Домінуючими амінокислотами у кореневищах із коренями та траві *Galium verum L.* є глутамінова кислота, лейцин, аспарагінова кислота, аланін і валін.

Підмаренник справжній (*Galium verum L.*) родини маренові (*Rubiaceae L.*) – рослина, що широко застосовується у народній медицині при захворюваннях шлунково-кишкового тракту, діареї, гепатитах, захворюваннях нирок, захворюваннях шкіри (екзема, дерматозах із больовим синдромом), гінгівітах і стоматитах. Широкий спектр застосування підмаренників обумовлений комплексом біологічно активних речовин, що в них містяться – антрахінони групи алізарину, флавоноїди, кумарини, фенолкарбонові кислоти, дубильні речовини, іридоїди, стероїдні сапоніни [4, 5, 6].

Раніше нами досліджувався елементний склад і склад ліпофільної фракції трави підмаренника справжнього [2, 3].

Амінокислоти є найбільш цінними структурними елементами рослин. Ряд біологічно активних речовин рослина синтезує з амінокислот: ферменти, вітаміни, бетаїни, алкалоїди, деякі фенольні сполуки тощо. Шляхом утворення глутаміну із глутамінової кислоти у живих організмах знешкоджується токсичний аміак. Відомості про вміст первинних амінокислот: аланіну, аспарагінової та глутамінової кислот, можуть надати важливу інформацію про наявність зв'язку між первинним і вторинним метаболізмом. Важлива роль як показників стійкості рослин до стресів належить, зокрема, аланіну та цистеїну.

У подальшому доцільним буде виявлення корелятивних зв'язків між вмістом амінокислот та флавоноїдів, оскільки відома їх провідна роль як агентів адаптації рослин до умов зростання, що змінюються.

Метою нашої роботи було визначення амінокислотного складу кореневищ із коренями та трави підмаренника справжнього (*Galium verum L.*).

Експериментальна частина

Дослідження білково-амінокислотного складу проводилось на зразках кореневищ із коренями та трави підмаренника справжнього, які

було заготовлено у липні 2007 року у Карпатах (околиці м. Яремче Івано-Франківської області) під час цвітіння рослини.

Для виявлення амінокислот близько 10.0 г (точна наважка) сировини, здрібненої до розміру частинок 0.5 мм, екстрагували 70 % спиртом 3 порціями, по 100 мл кожна, на киплячій водній бані. Отриманий екстракт концентрували до водного залишку (15-20) мл, кількісно перенесли у ділильну лійку та обробляли хлороформом 3 порціями, по 50 мл кожна. Очищений від ліпофільних речовин витяг нагрівали до видалення слідів хлороформу, перенесли у мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм 70 % спиртом до позначки.

Для очищення екстракт пропускали через іонообмінник. Для цього 10.0 г катіоніту КУ-2 обробляли 200 мл 1 М розчину кислоти хлористоводневої, після чого осад на фільтрі відмивали від кислоти водою до нейтральної реакції і поміщали на колонку (довжина – (20-25) см, діаметр – (1.5-2) см). До 10 мл екстракту додавали 40 мл води і пропускали через колонку зі швидкістю 1 мл/хв. Колонку промивали 50 мл 6 М розчину аміаку та 20 мл води. Розчин амінокислот упарювали на водній бані до сухого залишку. Залишок розчиняли при нагріванні у 50 % спирті. 0.05 мл очищеного екстракту наносили на хроматографічний папір Filtrak FN-3 і хроматографували у системі розчинників: н-бутанол - кислота оцтова - вода (БОВ – 4:1:2). Після висушування хроматограму проявляли 0.2 % розчином нінгідрину в ацетоні із подальшим нагріванням. Амінокислоти ідентифікували за забарвленням плям і значенням їх R_f у порівнянні з речовинами-свідками.

Загальний вміст амінокислот у досліджуваному зразку визначали за допомогою амінокислотного аналізатора LKB 4151 «Альфа Плюс» (Швеція) на колонці, заповненій катіонообмінною смолою «Ultropac 8» за загальновідомою методикою [1].

Результати досліджень та їх обговорення

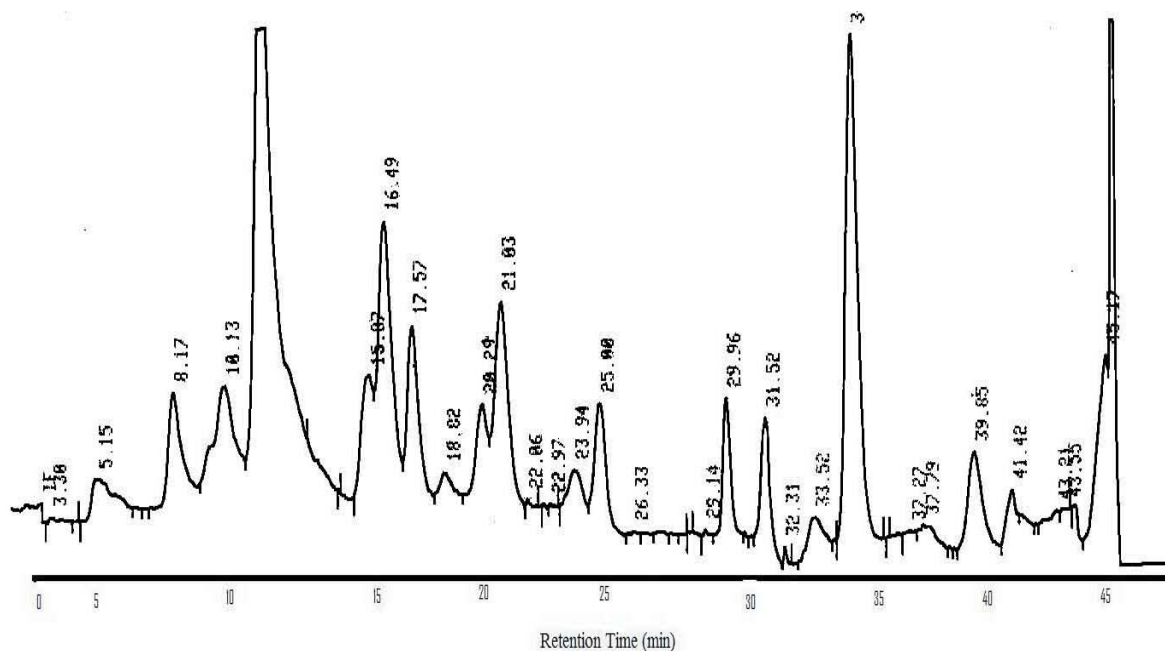
За допомогою паперової хроматографії та амінокислотного аналізатора LKB 4151 «Аль-

фа Плюс» у кореневищах із коренями та траві підмаренника справжнього було виявлено 15 амінокислот: аспарагінову кислоту, треонін, серин, глютамінову кислоту, гліцин, аланін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, тирозин, фенілаланін, гістидин, лізин, аргінін; із них 9 незамінних — треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, гістидин, лізин і аргінін. Схеми хроматограм надано на Рис. 1, 2. Якісний склад і кількісний вміст амінокислот у досліджу-

ваних зразках наведено в Таблиці та графічно показано на гістограмі (Рис. 3).

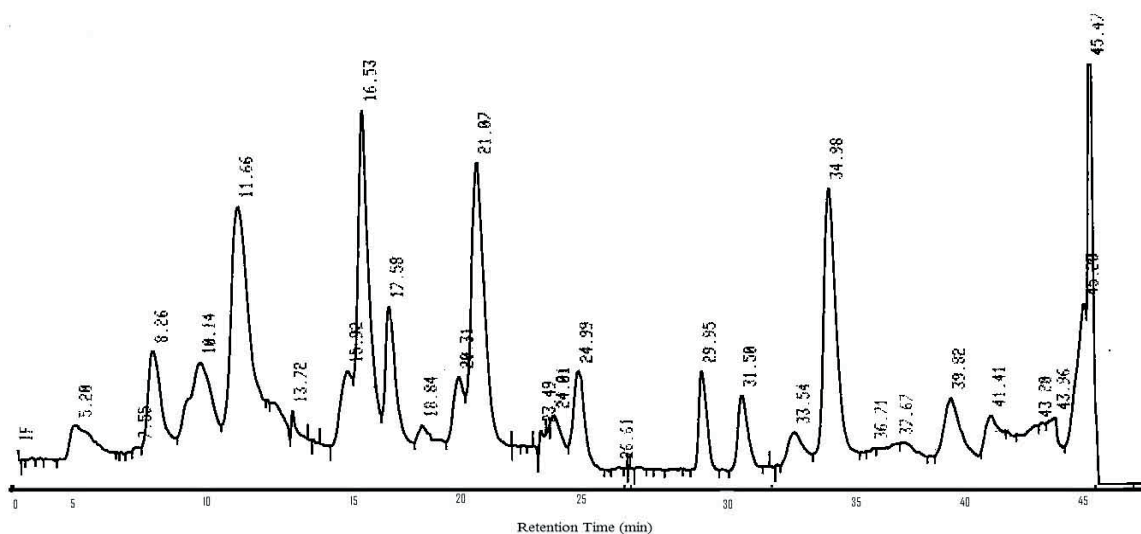
У кореневищах із коренями підмаренника справжнього переважно містяться глютамінова кислота — 23.52 % (від суми амінокислот), аспарагінова кислота — 8.74 %, лейцин — 10.58 %, валін — 7.01 % і аланін — 9.02 %. Така ж закономірність спостерігається у траві: глютамінова кислота становить 23.79 % (від суми амінокислот), аспарагінова — 7.91 %, лейцин — 10.66 %, валін — 6.40 % і аланін — 7.98 %.

Рисунок 1



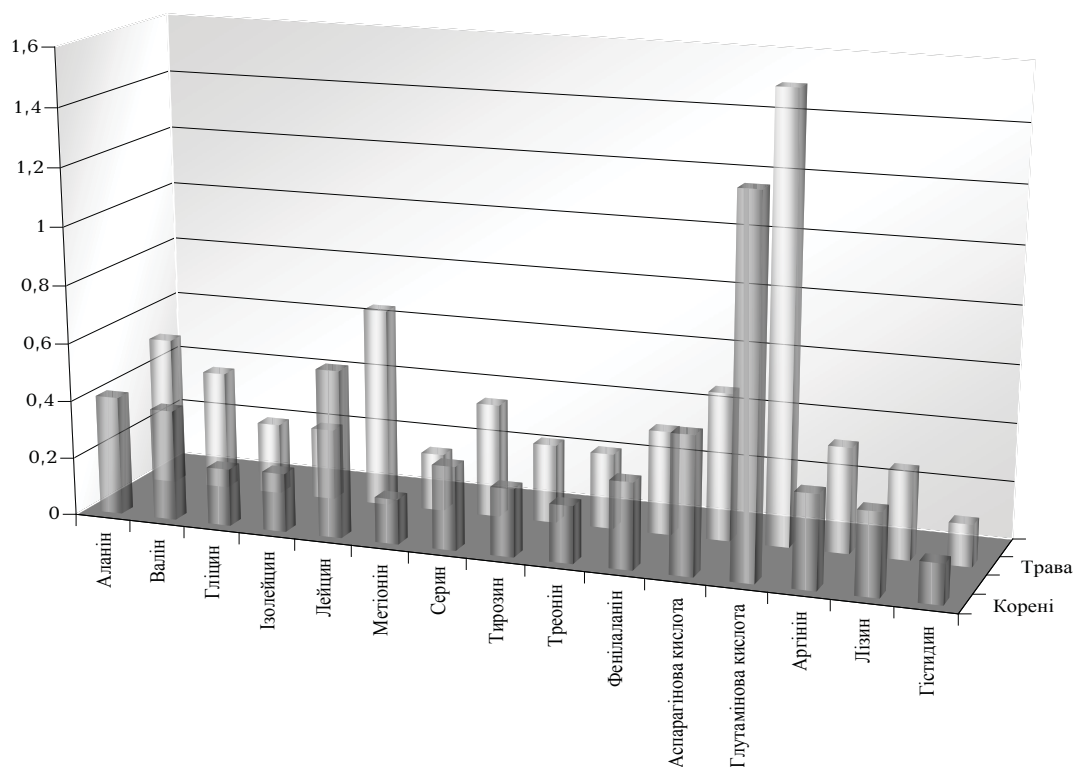
Хроматограма, одержана при визначенні вмісту амінокислот у кореневищах із коренями підмаренника справжнього

Рисунок 2



Хроматограма, одержана при визначенні вмісту амінокислот у траві підмаренника справжнього

Рисунок 3



Кількісний вміст амінокислот у кореневищах із коренями та траві підмаренника справжнього

Таблиця

Вміст амінокислот у кореневищах із коренями та траві підмаренника справжнього, у відсотках, у перерахунку на суху сировину

№	Амінокислота	R_f^*	Вміст у кореневищах із коренями	Вміст у траві
1	аланін	0.20	0.409	0.513
2	валін	0.43	0.381	0.411
3	гліцин	0.21	0.197	0.246
4	ізолейцин	0.72	0.202	0.246
5	лейцин	0.64	0.575	0.685
6	метіонін	0.39	0.155	0.198
7	серин	0.15	0.288	0.392
8	тирозин	—	0.233	0.271
9	треонін	0.18	0.197	0.260
10	фенілаланін	0.32	0.298	0.357
11	аспарагінова кислота	0.16	0.475	0.508
12	глутамінова кислота	0.17	1.278	1.529
13	аргінін	0.04	0.322	0.363
14	лізин	0.05	0.285	0.302
15	гістидин	0.10	0.138	0.145
сума незамінних амінокислот			2.553	2.967
сума замінних амінокислот			2.88	3.459
сума амінокислот			5.433	6.426

Примітка.

* — система розчинників н-бутанол — кислота оцтова — вода (4:1:2).

Очевидно, що інтенсивність біосинтезу замінних кислот дещо вища, ніж незамінних як у підземних органах — 2.88 % і 2.55 %, так і у траві — 3.46 % і 2.97 %, відповідно.

Найбільше підмаренник накопичує моноамінокарбонів та моноамінодикарбонів кислот, що для кореневищ із коренями становить 54.03 % і 32.27 %, для траві — 55.70 % і 32.27 % від загальної суми, відповідно.

Висновки

Вивчено якісний склад суми амінокислот (зв'язаних і вільних) у кореневищах із коренями та траві підмаренника справжнього. Виявлено 15 амінокислот, у тому числі 9 незамінних.

Встановлено, що вміст суми амінокислот у кореневищах із коренями становить 6.426 %, у траві — 5.433 %.

Виявлено, що домінуючими амінокислотами у кореневищах із коренями та траві підмаренника справжнього є глютамінова кислота, лейцин, аспарагінова кислота, аланін і валін.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бородіна Н.В., Ковальов С.В. Амінокислотний та мікроелементний склад *Populus tremula* L. // Фармаком. - 2003. - № 4. - С. 33-36.
2. Хімічне дослідження ліпофільної фракції траві підмаренника справжнього / Ільїна Т.В., Гриценко О.М., Горяча О.В., Ковальова А.М.: Зб. наук. пр. КМАПО ім. П.Л. Шупика. - Вип. 17. - Кн. 1. - Київ, 2008. - С. 748-752.
3. Ільїна Т.В., Ковальова А.М., Горяча О.В. Дослідження елементного складу підмаренників // Запорозький медичний журнал. - 2008. - Т. 1, № 2 (47). - С. 142-146.
4. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Carifoliaceae – Plantaginaceae – Л., 1990. – 326 с.
5. Iridoids, Flavonoids and Monoterpene Glycosides from *Galium verum* subsp. *Verum* / L. Ö. Demirezer, F. Gürbüz, Z. Güvenalp, K. Ströch, A. Zeeck // Turk. J. Chem. – 2006. - № 30. – P. 525–534.
6. Triterpene saponins and iridoid glucosides from *Galium rivale* / De Rosa, S., Iodice, C., Mitova, M., Handjieva, N.,

Popov, S., Anchev, M. // *Phytochemistry-Oxford*. - Vol. 54, № 8. - P. 751-756.

Резюме

Ільїна Т.В., Горячая О.В., Ковалева А.М., Андрусенко А.В., Комиссаренко А.Н.

Аминокислотный состав корневищ с корнями и травы подмаренника настоящего

Изучен качественный состав суммы аминокислот в корневищах с корнями и траве подмаренника настоящего (*Galium verum* L.). Обнаружено 15 аминокислот, в том числе 9 незаменимых. Установлено, что содержание суммы аминокислот в корневищах с корнями составляет 6.426 %, в траве — 5.433 %. Доминирующими аминокислотами в корневищах с корнями и траве подмаренника настоящего являются глютаминная кислота, лейцин, аспарагиновая кислота, аланин и валин.

Summary

Ilyina T.V., Goryachaya O.V., Kovalyova A.M., Andrusenko O.V., Komisarenko A.M.

Aminoacid composition of rhizomes and roots of *Galium verum* L.

The composition of the sum of aminoacids in rhizomes and roots of *Galium verum* L. was studied. 15 aminoacids, including 9 essential, were revealed. It was determined that the content of the sum of aminoacids in rhizomes and roots was 6.426 %, in herb was 5.433 %. Dominant aminoacids in rhizomes and roots and in herb of *Galium verum* L. were glutamic acid, leucine, aspartic acid, alanine and valine.

Ільїна Тетяна Василівна. К.фарм.н. Доцент кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету (НФаУ).

Горяча Ольга Володимирівна. Студентка 5 курсу НФаУ.

Ковальова Алла Михайлівна. Д.фарм.н. Професор НФаУ.

Андрусенко Олександр Васильович. Зав. хірургічного відділення 2 стоматологічної поліклініки, м. Харків.

Комиссаренко Андрій Миколайович. Д.фарм.н. Професор НФаУ.

УДК 577.112.3:577.118:581.446.2:582.579.2

Затильнікова О.О., Ковальов С.В.
Національний фармацевтичний університет

Вивчення амінокислотного та мінерального складу підземних органів *Iris pseudacorus* L.

Представлено результати вивчення якісного та кількісного складу амінокислот у кореневищах із коренями *Iris pseudacorus* L. Встановлено наявність 17 вільних амінокислот, 9 із яких є незамінними. У результаті дослідження елементного складу кореневищ із коренями відмічено високий вміст калію, кальцію, магнію, натрію, фосфору та заліза.

В останній час все більше уваги приділяється вивченню вмісту мінеральних елементів, пептидів, амінокислот у лікарській рослинній сировині та створення на їх основі нових лікарських засобів.

У рослинах амінокислоти є вихідним матеріалом для біосинтезу цілого ряду фізіологічно активних речовин: білків, алкалоїдів, поліфенолів, вітамінів тощо. Маючи широкий спектр фармакологічної дії, амінокислоти надають мікроелементам та іншим речовинам легкозасвоювані форми, які зразу потенціюють їх ефект. Амінокислоти беруть участь у процесах нервової, судинної та інших видах регуляції різних функцій організму. Тому одним із критеріїв оцінки біологічної активності лікарських рослин є визначення їх білково-амінокислотного складу [2].

Мікроелементи мають високу біологічну активність, беруть участь у великій кількості фізіологічних і біохімічних реакцій, що протікають в організмі, знаходяться у тісному зв'язку з іншими біологічно активними сполуками. Так, наприклад, натрій — один з основних катіонів, що бере участь у підтримці кислотно-основної рівноваги та осмотичного тиску позаклітинних рідин. Іони кальцію активують дію багатьох ферментів, сприяють згортанню крові, регулюють проникність клітинних мембран. Іони заліза входять до складу лікарських препаратів для лікування анемії. Магній знімає втому, нервові напруження, сприяє кращому засвоєнню кальцію. Він посилює імунітет, опірність кліток до канцерогенних факторів, сприяє запобіганню атеросклерозу та інфаркту. Відомо, що марганець забезпечує зниження гіперглікемії й утилізацію жиру. Мідь гальмує розпад та сприяє накопиченню глікогену у печінці, а також потенціює гіпоглікемічну дію інсуліну та використання глюкози м'язами [4, 8, 9].

У народній медицині широко використовують кореневища із коренями півників болотяних (*Iris pseudacorus* L., родина *Iridaceae*) як в'язучий, тонізуючий засіб; відвар кореневищ — при респіраторних інфекціях, пневмонії, язві шлунка,

як гемостатичний, послаблюючий засіб [3, 5, 7]. Кореневища півників входять до складу збору Здренка для лікування папіломатозів сечового міхура та катарів шлунка [6]. Хімічний склад даного виду цікавий вмістом флавоноїдів (апигенін, гіспідулін), ізофлавоноїдів (ірилін, іридин), кумаронохромонів, ефірної олії, деяких органічних кислот [7, 11, 12, 13].

Метою даної роботи є вивчення амінокислотного та мінерального складу підземних органів півників болотяних.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження обрано кореневища із коренями *Iris pseudacorus* L., що були заготовлені у вересні 2007 року у Харківській області (с. Борщове).

Амінокислотний аналіз

Попереднє вивчення якісного складу амінокислот у досліджуваній сировині проводили методом висхідної хроматографії на папері.

Близько 10 г (точна наважка) сировини, подрібненої до розмірів частинок 0.5 мм, екстрагували водою (1:10) на киплячій водяній бані. Водний витяг випарювали до залишку (15-20) мл та наносили на хроматографічний папір «Filtrak FN-4» у системі розчинників: н-бутанол - оцтова кислота - вода (БОВ — 4:1:2). Для порівняння використовували стандартний набір амінокислот (ТУ 6-09-3147-83) у концентрації 0.1 %. Хроматограму проявляли 0.2 % розчином нінгідрину в ацетоні та висушували у сушильній шафі при температурі (60-80) °С. Амінокислоти ідентифікували з достовірними зразками за забарвленням плям і визначенням їх R_f при паралельному хроматографуванні (Табл. 1) [10].

Кількісний вміст амінокислот визначали за допомогою амінокислотного аналізатора T339 Mikrotechna — Praha. Наважку сировини (300.0 г) поміщали у посудину місткістю 50 мл, додавали 10 мл дистильованої води та 10 мл концентрованої хлористоводневої кислоти, перемішували та витримували у термостаті при температурі 130 °С протягом 20 год. Після чого розчин фільтрували, упарювали, доводили рН до 2.2,

відбирали 50 мкл і вводили в амінокислотний аналізатор для дослідження зв'язаних і вільних амінокислот.

Якісний склад встановлювали шляхом порівняння часу утримування піка амінокислот проби зі стандартними зразками амінокислот. Кількісний аналіз проводили шляхом порівняння площ піків амінокислот проби зі стандартними зразками амінокислот і обчислювали за формулою:

$$C = \frac{S \times C_1}{S_1},$$

де:

C — концентрація амінокислоти у зразку;

S — площа піка амінокислоти у зразку;

C_1 — вміст амінокислоти у стандартному зразку амінокислоти;

S_1 — площа піка стандартного зразка амінокислоти.

Мінеральний склад

Для дослідження елементного складу кореневищ із коренями півників болотяних використано атомно-емісійний спектрографічний метод із фотографічною реєстрацією.

Наважку сировини обробляли сірчаною кислотою та нагрівали у муфельній печі при температурі 500 °С протягом 1 год [1]. Випарювання проб проводилося із кратерів графітових електродів у розряді дуги змінного струму (джерело збудження спектрів ИВС-28) при силі струму 16 А й експозиції 60 с. Для одержання спектрів та їхньої реєстрації на фотопластинках використовували спектрограф ДФС-8. Спектри фотографували в області довжин хвиль (240-347) нм. При визначенні було використано комплекс стандартних зразків СПГ-24 (ГСО 2820-83). Результати наведено в Табл. 2.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень амінокислотного складу кореневищ із коренями півників боло-

Таблиця 1

Якісний склад та кількісний вміст амінокислот у кореневищі півників болотяних

№ п/п	Амінокислота	Загальна формула	R_f БОВ (4:1:2)	Молекулярна маса,	Вміст вільних амінокислот		Вміст зв'язаних амінокислот	
				г/моль	мкмоль/г	мг/г	мкмоль/г	мг/г
1.	аспарагінова кислота	$C_4H_7O_4N$	0.16	133	3.15	0.42	2.6	0.35
2.	треонін	$C_4H_9O_3N$	0.18	119	1.1	0.13	1.25	0.15
3.	серин	$C_3H_7O_3N$	0.15	105	0.9	0.09	2.0	0.21
4.	глутамінова кислота	$C_5H_9O_4N$	0.17	147	2.45	0.36	4.35	0.64
5.	пролін	$C_5H_9O_2N$	0.24	115	0.23	0.026	0.77	0.09
6.	цистин	$C_6H_{12}O_4N_2S$	-	240	слідові кількості	слідові кількості	слідові кількості	слідові кількості
7.	гліцин	$C_2H_5O_2N$	0.21	75	1.5	0.11	2.25	0.17
8.	аланін	$C_3H_7O_2N$	0.20	89	0.7	0.06	1.9	0.17
9.	валін	$C_5H_{11}O_2N$	0.43	117	1.0	0.12	1.55	0.18
10.	метіонін	$C_5H_{11}O_2NS$	0.39	149	0.15	0.02	0.7	0.1
11.	ізолейцин	$C_6H_{13}O_2N$	0.72	131	0.6	0.08	1.0	0.13
12.	лейцин	$C_6H_{13}O_2N$	0.63	131	1.5	0.20	1.45	0.19
13.	тирозин	$C_9H_{11}O_3N$	0.57	181	0.35	0.06	0.65	0.12
14.	фенілаланін	$C_9H_{11}O_2N$	0.32	165	1.0	0.17	1.0	0.17
15.	гістидин	$C_6H_9O_2N_3$	0.10	155	0.55	0.09	0.56	0.09
16.	лізин	$C_6H_{14}O_2N_2$	0.05	146	2.5	0.37	2.75	0.4
17.	аргінін	$C_6H_{14}O_2N_4$	0.04	174	1.65	0.29	2.45	0.43

Таблиця 2.

Мінеральний склад кореневищ із коренями півників болотяних

Елемент	Fe	Si	Al	Mn	Mg	Pb	Mo	P	K	Ni	Ca	Cu	Zn	Na	Sr	Ti
Вміст, мг/100 г	40	140	20	4	120	0.1	0.03	70	700	0.1	280	0.1	2	110	2	<0.05

Примітка.

В усіх зразках: Co < 0.03 мг/100г; Cd < 0.001 мг/100г; As < 0.001 мг/100г; Hg < 0.001 мг/100г

тяних наведено в Табл. 1. У сировині було виявлено 17 вільних амінокислот, серед них 9 незамінних: треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, гістидин, лізин та аргінін. Встановлено, що домінуючими є глютамінова кислота, аспарагінова кислота, лізин, аргінін, гліцин, серін.

В результаті вивчення мінерального складу кореневищ із коренями півників болотяних встановлено наявність 16 елементів, із яких 7 — макроелементи, 9 — мікроелементи. Із виявлених елементів 7 — есенційні (Табл. 2). У кореневищах відмічено високий вміст калію (700 мг/г), кальцію (280 мг/100 г), магнію (120 мг/г), натрію (110 мг/г), фосфору (70 мг/г) та заліза (40 мг/г).

В усіх досліджених зразках у межах чутливості методу емісійної спектроскопії були відсутні арсен, ртуть, кобальт, сурма, ванадій і германій.

Висновки

Вперше вивчено якісний склад і кількісний вміст амінокислот у кореневищах із коренями півників болотяних. Встановлено мінеральний склад кореневищ із коренями півників болотяних. В результаті досліджень ідентифіковано 17 амінокислот, в тому числі 9 незамінних, та 16 елементів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Х.: РИРЕГ, 2001. — 556 с.
2. Аминокислоты в медицине / Западнюк В.И., Купраш Л.П., Зайка М.У., Безверхая И.С. — К.: Здоров'я, 1982. — 112 с.
3. Затыльнікова О.О., Ковальов В.М. Рослини роду півників — перспективна лікарська рослинна сировина // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів». — Харків: Вид-во НФаУ, 2008. — С. 56.
4. Исаев Ю.А. Лечение микроэлементами, металлами и минералами. — К.: Здоров'я, 1992. — 118 с.
5. Кюсов Т.А. Полный справочник лекарственных растений. - М.: Эксмо-пресс, 2001. - 992 с.
6. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия: Учебное пособие / Под ред. Яковлева Г.П., Блиновой К.Ф. - СПб.: СпецЛит, 2004.- 765 с.
7. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: цветковые растения, их химический состав, ис-

пользование: семейства Butomaceae-Typhaceae. - СПб.: Наука, 1994. — 271 с.

8. Хабаров А.А., Булатникова В.А, Кочина О.Ф. Биологическая роль химических элементов. — Курск: КГМУ, 1997. — 52 с.

9. Элементный состав листьев и цветов *Pentaphraguloides fruticosa* (L.) O. Schwarz различных экотипов, выращиваемых в Новосибирске / Храмова Е.П., Куценогий К.П., Ковальская Г.А., Чанкина О.В. // Растительные ресурсы. — 2002. — Т. 38. — Вып. 2. — С. 85–92.

10. Хроматография на бумаге / Под ред. И.М. Хайса, К. Мацка. - М.: Изд-во иностран. лит-ры, 1962. — 851 с.

11. Christine A. Williams, Jeffrey B. Harborne, Colasante M. Flavonoid and xanthone patterns in bearded *Iris* species and the pathway of chemical evolution in the genus // *Biochemical Systematics and Ecology*. - 1997. - Vol. 25, № 4. - P. 309-325.

12. Singh Narendra, Mahmood Umar, Kaul V.K. Isoflavonoids from *Iris kumaonensis* // *J. Indian Chem. Soc.* - 2005. - Vol. 82, № 186 - P. 87

13. Suleiman Al-Khalila, Hideki Tosab, Munekazu Iinuma. A xanthone C-glycoside from *Iris nigricans* // *Phytochemistry*. — 1995. — Vol. 38. - P. 729-731.

Резюме

Затыльнікова О. А., Ковалев С. В.

Изучение аминокислотного и минерального состава подземных органов *Iris pseudacorus* L.

Представлены результаты изучения качественного и количественного состава аминокислот в кореневищах с корнями *Iris pseudacorus* L. Установлено наличие 17 свободных аминокислот, 9 из которых являются незаменимыми. В результате изучения элементного состава кореневищ с корнями отмечено высокое содержание калия, кальция, магния, натрия, фосфора и железа.

Summary

Zatylnicova O.A., Kovalev S.V.

Study of amino acids and mineral composition of the underground organs of *Iris pseudacorus* L.

Data of the study of qualitative and quantitative composition of amino acids of rhizomes and roots of *Iris pseudacorus* L. The presence of seventeen free amino acids, nine of which are essential, was established. At the result of the study of rhizomes and roots elemental composition, the high content of potassium, calcium, magnesium, sodium, phosphorus and ferrum was established.

Затыльнікова Ольга Олександрівна. Закінчила Національний фармацевтичний університет (2007). Аспірант кафедри фармакогнозії НФаУ.

Ковальов Сергій Володимирович. Закінчив Національну фармацевтичну академію України (1994). К.фарм.н. (1997). Доцент кафедри хімії природних сполук НФаУ.

Лобурцова М.С., Гонтова Т.М., Хворост О.П.
Національний фармацевтичний університет

Амінокислотний склад сировини та густих екстрактів *Pulmonaria obscura* Dumort.

Визначено якісний та кількісний амінокислотний склад трави та підземних органів медунки темної (*Pulmonaria obscura* Dumort.) та густих екстрактів із цих видів сировини. Виявлено наявність 17 амінокислот. Домінуючими є глутамінова та аспарагінова кислоти.

Рід медунка (*Pulmonaria* L.) родини шорстколисті (*Boraginaceae* Juss.) у флорі України представлений 6 видами [8, 4]. У Харківській області поширена медунка темна (*Pulmonaria obscura* Dumort.), що росте у змішаних лісах, дібровах [4]. М. темна — гарний медоніс, використовується в кулінарії як харчова, популярна у квітникарстві як декоративна рослина. В Україні рослина неофіційна. У народній медицині застосовується при гострих респіраторних захворюваннях, бронхопневмоніях, як відхаркувальний, протизапальний і вітамінний засіб. Також м. темна виявляє в'язучу, гемостатичну, обволікаючу, болезаспокійливу дію [3, 6]. У траві цієї рослини міститься слиз, каротиноїди, вітамін С, рутин, дубильні речовини тощо [3]. Відомостей про вміст амінокислот у сировині медунки у доступній літературі ми не знайшли. Ці сполуки є компонентами клітинного соку та беруть участь у синтезі ферментів, вітамінів. У медичній практиці амінокислоти застосовують для лікування печінки, шлунково-кишкового тракту, нервово-психічних розладів, для профілактики атеросклерозу. Відомо, що незамінні амінокислоти — валін, лейцин та ізолейцин, пригнічують розвиток злоякісних пухлин та підвищують імунітет [2, 9].

Метою даної роботи було вивчення якісного складу та кількісного вмісту амінокислот трави та підземної частини (кореневища з коренями) м. темної та густих екстрактів із цих видів сировини.

Матеріали та методи

Траву та підземні органи заготовляли у змішаному лісі Харківської області (с. Липці) у фазу масового цвітіння (травень 2008 року). Для аналізу використовували середню пробу серії 14.05.08 (трава - загальна вага 6 кг, підземна частина 3 кг). Із обох видів сировини м. темної було отримано густі екстракти методом дрібної мацерації [5] (параметри екстракції — екстрагент — вода, співвідношення сировина-екстрагент 1:15, кратність -3 зливи, час одного настоювання — 12 год, температура процесу — 25 °С. Вихід субстанцій: із трави — 33.18 % (втрата в масі

при висушуванні 22.5 %), із підземної частини — 47.50 % (втрата в масі при висушуванні 21.8 %). Якісний склад і кількісний вміст амінокислот визначали за допомогою амінокислотного аналізатора ААА-339. Точну наважку екстракту гідролізували 6 М розчином кислоти хлористоводневої з подальшим видаленням останньої. Умови хроматографування: стандартна скляна колонка (виробництво Чехія), набивка — іонообмінна смола LG - AND, автоматичне дозування проб, температурний режим (18-32) °С. Кількісну оцінку проводили за площею піків у порівнянні зі стандартними зразками амінокислот фірми «Fluka» [1].

Результати досліджень та їх обговорення

Результати вивчення якісного складу та кількісного вмісту амінокислот у сировині та густому екстракті м. темної наведено в Таблиці.

Якісний склад амінокислот однаковий для всіх досліджуваних об'єктів. Ідентифіковано 17 амінокислот, із яких 7 - незамінні. Вміст загальної суми амінокислот у траві та в густому екстракті трави майже однаковий і складав 5152.43 мкг/100 мг та 5162.99 мкг/100 мг, відповідно. У підземних органах вміст амінокислот в 1.2 рази нижчий ніж у густому екстракті та майже в 1.5 рази нижчий ніж у траві. У густому екстракті трави вміст амінокислот вищий в 1.2 рази ніж у густому екстракті підземних органів. Вміст замісних амінокислот перевищував вміст незамінних в 1.8 рази у густому екстракті трави та більше ніж вдвічі в інших досліджених об'єктах. У траві містилося 3444.40 мкг/100 мг замісних амінокислот, що майже в 1.4 рази вище, у порівнянні зі вмістом цієї групи амінокислот в підземних органах (2535.50 мкг/100 мг). Вміст незамінних амінокислот в густих екстрактах трави та підземних органах вищий в 1.1 рази ніж в густих екстрактах сировини. При цьому вміст цієї групи амінокислот у траві вищий в 1.8 рази ніж в підземних органах, а в густому екстракті трави вищий майже в 1.7 рази ніж в густому екстракті підземних органів. В усіх об'єктах, що вивчалися, домінуючими компонентами є глутамінова та аспарагінова кислоти.

У траві глутамінової кислоти майже в 1.5 рази більше ніж в підземних органах, а в густому екстракті трави — в 1.3 рази більше ніж в густому екстракті підземних органів. Вміст аспарагінової кислоти досить високий в усіх об'єктах, що досліджувались (Таблиця). У значній кількості в підземних органах та в густому екстракті трави містився аргінін (478.50 мкг/100 мг і 458.43 мкг/100 мг, відповідно). Вміст проліну в густому екстракті підземних органів м. темної складав 439.70 мкг/100 мг, що майже у 2.5 рази більше ніж в сировині та в 1.7 рази більше ніж в густому екстракті трави. Із незамінних амінокислот у густому екстракті трави у значних кількостях містився лізин (522.15 мкг/100 мг). Це майже у 2.4 рази більше ніж в сировині та в 5 разів більше ніж в густому екстракті підземних органів м. темної. У траві м. темної фенілаланіну містилося 381.50 мкг/100 мг, що у 4 рази більше ніж в підземних органах, а лейцину 348.80 мкг/100 мг, що у 2.1 рази більше ніж в підземних органах.

Висновки

Вивчено якісний склад та кількісний вміст амінокислот у траві та підземних органах м. темної та густих екстрактах із цих видів сировини. Якісний амінокислотний склад усіх об'єктів, що вивчалися, однаковий. Виявлено наявність не менше 17 сполук цієї природи. Домінуючими в усіх об'єктах є глутамінова та аспарагінова кислоти. Отримані дані можуть бути враховані у подальших дослідженнях сировини м. темної з метою розробки фітокомпозиції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Киселева Т.Л. Состав свободных аминокислот лекарственных препаратов из листьев, цветков и плодов *Crateagus alemanniensis* Cinovskis. / Киселева Т.Л., Самылина И.А. // Раст. ресурсы. — 1989. — Т. 25. — Вып. 4. - № 3. — С. 546-552.
2. Ковалев В.Р. Нейроактивные аминокислоты и регуляция кровообращения: Сб. науч. тр. Волгоград. мед. ин-та. — Волгоград, 1977. — Т. 30. - Вып. 3. — С. 13-30.
3. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник / Відп. ред. Гродзинський А.М. — К.: Гол. ред. УРЕ, 1991. — 543. с.
4. Определитель высших растений Украины / Добрячаева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др. - К.: Наук. думка, 1987. - 548с.

Таблиця

Амінокислотний склад трави та підземних органів медунки темної та густих екстрактів із цих видів сировини

№	Назва амінокислоти	Вміст амінокислоти (мкг/100 мг)			
		підземні органи медунки темної		трава медунки темної	
		сировина**	густий екстракт***	сировина**	густий екстракт***
1.	валін*	176.00	133.40	174.40	187.62
2.	лейцин*	165.00	190.90	348.80	307.98
3.	ізолейцин*	110.00	172.50	201.65	277.89
4.	треонін*	154.00	165.60	291.03	203.55
5.	метіонін*	74.80	161.00	92.65	86.73
6.	лізин*	188.10	115.00	218.00	522.15
7.	фенілаланін*	95.00	144.90	381.50	253.11
8.	глутамінова кислота	550.00	676.20	795.70	854.91
9.	гліцин	165.00	230.00	381.50	223.02
10.	аланін	132.00	250.70	218.00	256.65
11.	серин	170.50	190.90	327.00	215.94
12.	аспарагінова кислота	550.00	574.00	637.65	693.84
13.	аргінін	478.50	368.00	425.10	458.43
14.	тирозин	104.50	154.10	158.05	226.5
15.	гістидін	198.00	225.40	174.40	138.06
16.	пролін	187.00	439.70	327.00	256.55
17.	цистеїн	слідові кількості	слідові кількості	слідові кількості	слідові кількості
Сума незамінних кислот		962.90	1083.30	1708.03	1839.03
Сума замінних кислот		2535.50	3109.00	3444.40	3323.96
Загальна сума амінокислот		3498.40	4192.30	5152.43	5162.99

Примітки:

* - незамінні амінокислоти,

** - у перерахунку на абсолютно суху сировину,

*** - у перерахунку на абсолютно суху речовину.

5. Промислова технологія ліків: Підручник: У 2 т. — Т. 2 / Чушнов В.І., Чернов М.Ю., Хохлова Л.М. та ін. / За ред. проф. В.І. Чушнова. - Х.: Основа; Вид-во УкрФА, 1999. — С. 71.
6. Семейства Boraginaceae // Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. - Л.: Наука, 1990. — С. 109-132.
7. Системная фитотерапия: Учеб. пособие для студ. вузов / Под ред. Кисличенко В.С., Зайченко А.В., Журавель И.А. — Харьков: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2008. — 256 с.
8. Черепанов С.К. Сосудистые растения СССР. - Л.: Наука, 1981. - 510 с.
9. Benson J.R. Some recent advances in amino acid analysis // Instrumentation in amino acid sequene analysis. — London; New York; San Francisco, 1975. — P. 1-40.

Резюме

Лобурцова М.С., Гонтова Т.Н., Хворост О.П.

Аминокислотный состав сырья и густых экстрактов *Pulmonaria obscura Dumort.*

Проведено определение качественного состава и количественного содержания аминокислот в траве и подземных органах медуницы темной (*Pulmonaria obscura Dumort.*) и густых экстрактах из данных видов сырья. Выявлено 17 аминокислот. Доминирующими аминокислотами во всех

изученных объектах являются глутаминовая и аспарагиновая кислоты.

Summary

Loburtsova M.S., Gontovaya T.N. Khvorost O.P.

Amino acid composition of the herbal drug and soft extracts of *Pulmonaria obscura Dumort.*

Qualitative and quantitative amino acid content in herb and underground organs of *Pulmonaria obscura Dumort.* and soft extracts of these kinds of herbal drug have been determined. A presence of 17 amino acids was found. The main amino acids were glutamic and aspartic acids.

Лобурцова Марія Сергіївна. Закінчила Національний фармацевтичний університет (2004). Здобувач кафедри ботаніки НФаУ.

Гонтова Тетяна Миколаївна. Закінчила Харківський фармацевтичний інститут (1991). К.фарм.н.(1997). Доцент кафедри ботаніки НФаУ.

Хворост Ольга Павлівна. Закінчила Харківський фармацевтичний інститут (1982). Д.фарм.н. (2006). Професор(2008) кафедри ботаніки НФаУ.

Готові лікарські засоби

УДК 615.26:578.81

Ткач М.М., Стрельников Л.С., Ткачова О.В., Кабачний Г.І.
Національний фармацевтичний університет

Вивчення специфічної активності та гострої токсичності нової лікарської форми з бактеріофагом стафілококовим в умовах *in vitro* та *in vivo*

Експериментально вивчено специфічну активність і гостру токсичність нового лікарського засобу у вигляді гелю з бактеріофагом стафілококовим. В умовах *in vitro* встановлено, що досліджуваний препарат не поступався за антимікробною активністю відомому препарату порівняння — розчину бактеріофага стафілококового. В умовах *in vivo* гель із бактеріофагом стафілококовим за динамікою тензіометричних і мікробіологічних показників на моделі гнійних ран у мишей, спричинених стафілоковою інфекцією, виявив лікувальний ефект, що перевищив ефект бактеріофага стафілококового у вигляді розчину. Дослідження гострої токсичності при одноразовому нашкірному нанесенні гелю у трьох дозах показало відсутність токсичної дії випробовуваного препарату.

Медична статистика свідчить про зростання резистентності мікроорганізмів до антибіотиків в умовах їх широкого використання. При цьому знижується ефективність лікування та збільшується кількість побічних явищ. Окремо слід відзначити розповсюдження стафілокової інфекції шкіри та м'яких тканин, до яких відносяться стафілококові піодермії, гнійно-запальні захворювання. На сьогоднішній день в економічно розвинених країнах хворі на піодермію, викликану стафілококами, складають 1/3 пацієнтів, що страждають на стафілококові захворювання, а у структурі дерматозів займають перше місце [1].

Сучасна фармакотерапія піодермій передбачає використання антибактеріальних препаратів. До цих препаратів висуваються такі вимоги [2]: висока активність щодо збудників за-

хворювання, здатність проникати в інфекційне середовище, створюючи там концентрації, що значно перевищують мінімальну пригнічуючу концентрацію для даного збудника, високий ступінь безпеки, тобто препарат має добре переноситися хворим навіть у високих терапевтичних дозах, бути зручним у застосуванні, мати оптимальний фармакоеконічний показник ефективності витрат при лікуванні.

Найчастіше для лікування стафілодермій використовують антибіотики й антисептики [3]. Але, як вже було зазначено, їх застосування призводить до зниження чутливості патогенної мікрофлори до цих антимікробних засобів. Крім того, застосування препаратів даних фармакологічних груп є небезпечним для вагітних і жінок, які годують груддю, осіб із підвищеною чутливістю до даних препаратів, дітей молод-

шого віку [4]. Особливо гостро стоїть питання застосування антибіотиків у дітей. Так, згідно з рекомендаціями ВООЗ за 2007 рік, у переліку лікарських засобів (ЛЗ) для дітей до дерматологічних ЛЗ антимікробної дії відноситься небагато препаратів: водний розчин метилрозанілінію хлориду, мазь із бацитрацином, водний розчин калію перманганату, крем сульфадіазину срібла. Як видно, перелік таких препаратів надто обмежений. Все вищезазначене спонукає до пошуку альтернативи антибіотикам і антисептикам.

В якості альтернативних препаратів для лікування дерматологічних захворювань, спричинених патогенною мікрофлорою, можуть бути використані бактеріофаги, які представляють собою групу специфічних за своїми властивостями вірусів, що паразитують на бактеріальних клітинах. Антимікробна дія бактеріофагів спрямована на лізис бактеріальної клітини, що відбувається у декілька етапів:

- 1) адсорбція бактеріофагів на бактеріальних клітинах,
- 2) проникнення ДНК бактеріофага у внутрішнє середовище бактерії,
- 3) реплікація копій ДНК бактеріофага,
- 4) синтез капсиду та відростків фагових віріонів,
- 4) складання віріонів, лізис бактеріальної клітини.

Бактеріофаги, що виходять у культуральне середовище в результаті лізису бактеріальних клітин, повторно інфікують, а потім лізують інші бактеріальні клітини.

У клінічних дослідженнях різних бактеріофагів було доведено, що вони є абсолютно нешкідливими та високо селективними препаратами. Завдяки високій швидкості їх дії бактеріальна мікрофлора не встигає виробляти механізми резистентності. На сьогоднішній день бактеріофаги є все більш перспективними порівняно з антибіотиками, а іноді - єдиними можливими ефективними ЛЗ, завдяки яким можна лікувати як піодермії, інфекції м'яких тканин, так і багато інших захворювань [5, 6].

На даний час в Україні використання препаратів бактеріофагів досить обмежене. На фармацевтичному ринку бактеріофаги, що лізують патогенний штам стафілокока, представлено лише двома препаратами імпортного виробництва (Росія): розчини бактеріофага стафілококового та секстафага.

У зв'язку із вищезазначеним на кафедрі біотехнології НФаУ розробляється нова лікарська форма (ЛФ) бактеріофага стафілококового у формі гелю, яка задовольняє вимогам, що пред'являються до препаратів для місцевого застосування і має суттєві переваги перед вже існуючою рідкою ЛФ бактеріофага стафілококового: більш тривалий контакт із місцем ураження, зручність використання, висока біодоступність препарату завдяки використанню допоміжних речовин - карбомеру та макроголу, резорбтивна дія.

Метою даної роботи стало вивчення специфічної активності та гострої токсичності нового гелю, що містить бактеріофаг стафілококовий, під умовною назвою «Піофаг-гель».

Об'єкти та методи

Піофаг-гель являє собою дисперсну систему, до складу якої входить гелеутворювач Carbopol 934p, макрогол 1500, бактеріофаг стафілококовий. Вивчення специфічної активності гелю проводили методом Апельмана, що полягає у визначенні максимального ступеня десятикратного розведення, при якому відбувається лізис тест-культури [5]. Для перевірки специфічної активності також був використаний метод дифузії в агар (метод «колодязів»), оскільки він є загальноприйнятим для м'яких лікарських форм [7]. Метод полягає у дифузії фагових частинок крізь товщу м'ясо-пептонного агару (МПА), спричинюючи таким чином затримку росту тест-культури. В якості тест-культури використовували штам *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Дослідження лікувальної дії Піофаг-гелю проводили в умовах *in vivo* на моделі гнійної рани [7], спричиненої штамом стафілокока золотого

Таблиця 1

Специфічна активність препарату «Піофаг-гель» та розчину бактеріофага стафілококового

Досліджуваний препарат	Активність, визначена методом Апельмана	Зони затримки росту <i>S. aureus</i> , мм
Піофаг-гель	10 ⁻⁵	36.0±2.1
розчин бактеріофага стафілококового	10 ⁻⁶	19.0±1.9

Примітки:

n=5;

P=95.

Таблиця 2

Тензіометричні та мікробіологічні показники на моделі гнійної рани, спричиненої стафілококовою інфекцією у мишей

Доба лікування	Група тварин					
	позитивний контроль		Піофаг-гель		розчин бактеріофага стафілококового	
	площа рани, мм ²	КУО в 1 мл гнійного відокремлюваного	площа рани, мм ²	КУО в 1 мл гнійного відокремлюваного	площа рани, мм ²	КУО в 1 мл гнійного відокремлюваного
вихідні дані	3.54±0.45	1.2·10 ⁷ -3.6·10 ⁷	3.11±0.35	1.6·10 ⁶ -3·10 ⁶	3.11±0.38	0.9·10 ⁶ -10·10 ⁶
2	5.92±1.08		2.62±0.42		3.09±0.22	
3	6.63±0.75	0.9·10 ⁶ -1.4·10 ⁶	2.16±0.9	1.2·10 ⁴ -3·10 ³	4.02±0.61	1.2·10 ⁵ -5·10 ⁵
4	6.83±0.55		1.5±0.58		4.79±0.51	
5	5.65±0.72	0.12·10 ⁶ -3·10 ⁶		0	5.71±0.91	0.9·10 ³ -3.6·10 ³
6	6.03±0.68				4.21±0.72	
7	7.04±0.53	0.2·10 ⁶ -0.9·10 ⁶		0	2.54±0.56	120
8	6.77±1.12				1.2±0.55	
9	6.0±1.07	5.5·10 ⁴ -3·10 ⁵		0	1±0.29	0
10	4.79±1.09					
11	3.36±0.28					
12	4.29±0.59					
13	4.79±1.09					

Примітки:

n=8;

P=90.

вого, що є частим збудником піогенних інфекцій. Для відтворення гнійної рани білим статево-зрілим мишам жіночої статі масою (17-19) г на депільовану ділянку шкіри внутрішньошкірно вводили 0.1 мл добових агарових культур *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Перед інфікуванням мікробну суміш стандартизували за оптичним стандартом каламутності на 10 ОД, виходячи із навантаження 10⁹ мікробних клітин на 1 мл для стафілокока.

Через 48 годин після зараження на ділянці введення культур стафілокока розвивалися гнійно-некротичні рани, що, у залежності від величини й інтенсивності ураження, піддавалися зворотньому розвитку через 9-15 діб.

Препаратом порівняння був розчин бактеріофага стафілококового (виробник «Мікроген»,

Росія), що використовували як аналог за фармакологічною дією. Розчин бактеріофага стафілококового являє собою колоїдно-дисперсну систему, дисперсна фаза якої є віріони бактеріофагів, а дисперсійне середовище — вода.

У кожній групі було використано по 8 тварин, включаючи групу позитивного контролю, тварин якої не лікували. Препарати наносили на зону ураження щоденно. Ефективність лікування оцінювали на підставі величини й інтенсивності ураження у дослідних групах у порівнянні із позитивним контролем, загибелі тварин при генералізації гнійного процесу, кількісної динаміки мікроорганізмів у рані. Висівання ранового ексудату проводили на МПА та середовище Чистовича (для ідентифікації стафілококів) [8].

Таблиця 3

Показники смертності (ПКС) на моделі гнійної рани у мишей, спричиненої стафілококовою інфекцією

Група тварин	Доба лікування										ПКС (кількість, %)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
позитивний контроль		1 тварина (12.5 %)	2 тварини (25 %)		1 тварина (12.5 %)							4 тварини (50 %)
Піофаг-гель					1 тварина (12.5 %)							1 тварина (12.5 %)
розчин бактеріофага стафілококового					2 тварини (25%)			1 тварина (12.5%)				3 тварини (37.5 %)

Примітка.

n=8

Перед забором матеріалу рани обробляли 70 % спиртом, потім ізотоничним розчином натрію хлориду 0.9 % (із метою видалення поверхнево вегетуючої мікрофлори та самого препарату). На фоні знеболання ранової поверхні 5 % розчином піромекаїну за допомогою голки для пункційної біопсії висікали ділянку тканини, зважували її, визначали коефіцієнт перерахунку на 1 г тканини, суспензували в ізотоничному розчині натрію хлориду 0.9 % із розрахунку 1:10, розводили до 10^{-3} та висівали по 0.1 мл із кожного розведення на відповідне живильне середовище. Визначення кількості мікроорганізмів у тканинах визначали за стандартною методикою [7].

Гостру токсичність Піофаг-гелю вивчали при одноразовому нашкірному нанесенні на мишах, вирощених на стандартному раціоні в розпліднику віварію Центральної науководослідної лабораторії НФаУ. В експерименті використовували 24 миші. У тварин проводилася відповідна підготовка шкіри. На депільовану її ділянку, що складала 50 %, 60 % та 70 % від загальної площі шкіри, наносили Піофаг-гель у дозах 10000 мг/кг, 12500 мг/кг та 15000 мг/кг, відповідно. Спостереження за тваринами проводили протягом 2 тижнів згідно з методичними рекомендаціями [9]. Статистичну обробку даних проводили відповідно до вимог Державної Фармакопеї України [10].

Результати досліджень та їх обговорення

Антистафілококова активність Піофаг-гелю та розчину бактеріофага стафілококового, визначена методами Аппельмана і дифузії в МПА, наведена в Табл. 1.

Результати, наведені в Табл. 1, свідчать про те, що розроблений гель має активність, визначену методом Аппельмана, 10^{-5} , що незначно поступається активності розчину бактеріофага стафілококового. Антимікробна активність Піофаг-гелю, визначена методом дифузії в агар, перевищує активність препарату порівняння, оскільки зони затримки росту *S. aureus* майже у 2 рази (36.0 ± 2.1) перевищують зони затримки росту мікроорганізмів під дією розчину бактеріофага стафілококового (19.0 ± 1.9). На наш погляд, це пов'язано з тим, що Піофаг-гель, дифундуючи крізь товщу агару, несе у просторі утвореної карбомером сітки бактеріофаги. Карбомер має більшу спорідненість до агару, внаслідок чого і утворюються більші зони лізису тест-культури. Отже, Піофаг-гель, маючи більшу здатність до дифузії, при зовнішньому застосуванні буде глибше проникати до інфекційного середовища, утворюючи таким чином більш високі кон-

центрації, і швидше потрапляти до кровотоку, створюючи резорбтивний ефект.

Для підтвердження отриманих даних в умовах *in vivo* специфічну антистафілококову активність препарату «Піофаг-гель» було вивчено на моделі гнійно-запальної рани у білих мишей. Результати дослідження лікувальної дії Піофаг-гелю на моделі гнійної рани, спричиненої стафілококом у білих мишей, наведено в Табл. 2.

Дослідження показало, що у групі тварин позитивного контролю протягом експерименту відмічалася затримка зменшення титру мікробної контамінації ран і прогресування гнійно-некротичного процесу, про що свідчить висока летальність тварин — 50 % (Табл. 3).

Порівняння ефективності Піофаг-гелю і розчину бактеріофага стафілококового з урахуванням динаміки бактеріологічного кількісного контролю ранового вмісту показало, що більш виражену лікувальну дію на моделі гнійної рани виявив Піофаг-гель. Вихідні показники вмісту мікроорганізмів у рановому ексудаті були дуже високими і становили $1 \cdot 10^6$ - $3 \cdot 10^6$ для *S. aureus*. Після 1-ої доби лікування Піофаг-гелем вміст мікроорганізмів знизився на 3 порядки та становив, відповідно, $1.2 \cdot 10^3$ - $5 \cdot 10^3$ для культури *S. aureus*. Відсутність висіву *S. aureus* спостерігалась на 4 добу від початку лікування. Під впливом розчину бактеріофага стафілококового очищення ран від гнійного ексудату та повне загоєння відбувалось пізніше, про що свідчать бактеріологічні показники та значна летальність тварин (37.5 %) у цій групі (Табл. 2, Табл. 3).

Аналізуючи отримані дані, можна зробити висновок про те, що Піофаг-гель на фоні препарату порівняння виявив високу ефективність при лікуванні гнійних ран, що проявилось у зниженні вмісту мікроорганізмів у рані на 3-ю добу лікування та повній відсутності мікробного обсіменіння починаючи від 5-ї доби лікування, а також у позитивній динаміці маси тіла тварин і зменшенні площі ран у порівнянні з вихідними показниками (Табл. 2, Табл. 4).

Таким чином, Піофаг-гель виявив виражену лікувальну дію на моделі гнійної рани стафілококової етіології, що перевершує ефективність імпортного розчину бактеріофага стафілококового.

Результати дослідження гострої токсичності показали, що після одноразового нашкірного нанесення препарату «Піофаг-гель» протягом 2-х тижнів спостережень не було виявлено інтоксикації у мишей (Табл. 5).

Шкіра тварин і рефлекторне збудження були збережені у нормі. Усі тварини до кінця експерименту залишались активними.

Таким чином, результати проведеного дослідження свідчать про відсутність токсичного впливу Піофаг-гелю та високу фармакотерапевтичну дію у порівнянні з відомим препаратом - розчином бактеріофага стафілококового. Це дає підставу вважати перспективними подальшу роботу із розробки технологічної, апаратурної схем, технологічного регламенту, проекту АНД на Піофаг-гель та подальше вивчення фармакодинаміки і токсичної дії нового лікарського препарату для впровадження його в медичну практику.

Висновки

В умовах *in vitro* встановлено, що гель із бактеріофагом стафілококовим під умовною назвою «Піофаг-гель» має у 2 рази більший показник антимікробної активності у порівнянні з відомим аналогом - розчином бактеріофага стафілококового.

В умовах *in vivo* виявлено виражену лікувальну дію препарату «Піофаг-гель» і встановлено, що загоєння та очищення ран при його використанні відбувається у 2 рази швидше.

Дослідження гострої токсичності препарату «Піофаг-гель» на мишах при нашкірному нанесенні в дозах 10000 мг/кг, 12500 мг/кг та 15000 мг/кг показало відсутність токсичної дії. Згідно з класифікацією токсичних речовин Піофаг-гель відноситься до VI класу токсичності — відносно нешкідливі речовини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Рациональный выбор антибиотикотерапии при пиодермиях / Нажмутдинова Д.К., Таха Т.В. // Дерматология. Косметология и пластическая хирургия. — 2008. — Т. 16, № 8. — С. 552-555.
2. Фармацевтические и биологические аспекты мазей: Монография / Перцев И.М., Котенко А.М., Чуешов О.В.,

Халеєва Е.Л. — Х.: Изд-во НФаУ: «Золотые страницы», 2003. — 288 с.

3. Машкиллейсон А.Л. Лечение кожных болезней / Машкиллейсон А.Л. — М. — Медицина, 1990 — 429 с.

4. Посохова К.А. Антибиотики / Посохова К.А., Вікторов О.П. — Тернопіль: ТДМУ, 2005. — 296 с.

5. Функнер Е.В. Микробиологические и технологические аспекты разработки комплексного препарата бактериофагов: Автореф. дис. ... к.мед.н. - Пермь, 2007. — 23 с.

6. Результаты изучения клинической эффективности новых препаратов бактериофагов при лечении гнойно-воспалительных заболеваний, вызванных условно-патогенными бактериями / Ворошилова Н.Н., Боговазова Г.Г., Казакова Т.Б. и др. // Материалы науч.-практ. конф.: Диагностика, профилактика и лечение гнойно-септических заболеваний лекарственными средствами, выпускаемыми НПО «Иммунопрепарат». - Уфа, 1993. - С. 26-31.

7. Даценко Б.М. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных препаратов для местного лечения гнойных ран / Доценко Б.М., Бирюкова С.В., Тамм Т.И. - М.: МЗ СССР, 1989. — 47 с.

8. Галынкин В.А. Питательные среды / Галынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И., Курбанова И.З. — СПб.: Проспект науки, 2006. — 336 с.

9. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За редакцією О.В. Стефанова. - К.: «Авіцена», 2001. - 528 с.

10. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр. — 1-е вид. — Харків: PIPEG, 2001. — 556 с.

Резюме

Ткач М.Н., Стрельников Л.С., Ткачева О.В., Кабачный Г.И.

Изучение специфической активности и острой токсичности новой лекарственной формы с бактериофагом стафилококковым в условиях *in vitro* и *in vivo*

Експериментально изучена специфическая активность и острая токсичность нового лекарственного средства в виде геля с бактериофагом стафилококковым. В условиях *in vitro* установлено, что исследуемый препарат не уступал по антимикробной активности известному препарату сравнения — раствору бактериофага стафилококкового.

Таблиця 4

Показники маси мишей на моделі гнійної рани, спричиненої стафілоковою інфекцією

Доба лікування	Контроль	Піофаг-гель	Розчин бактеріофага стафілококового
1	18.2±1.07	17.9±0.85	17.5±0.72
5	17.7±1.87	19.9±1.47	17±0.77
9	15.8±0.95	21.1±1.45	16±0.79

Примітки:

n = 8;

P = 0.95.

Таблиця 5

Дослідження гострої токсичності Піофаг-гелю при нашкірному нанесенні мишам

Відсоток площі поверхні тіла мишей	Доза препарату, мг/кг	Загибель тварин/ кількість тварин
50%	10000	0/8
60%	12500	0/8
70%	15000	0/8

В условиях *in vivo* гель с бактериофагом стафилококковым по динамике тензиометрических и микробиологических показателей на модели гнойных ран у мышей, вызванных стафилококковой инфекцией, проявил лечебный эффект, превышающий эффект бактериофага стафилококкового в виде раствора. Исследование острой токсичности при однократном нанесении геля в трех дозах показало отсутствие токсического действия исследуемого препарата.

Summary

Tkach M.M., Strelnikov L.C., Tkacheva O.V., Kabachniy G.I

Study of specific activity and acute toxicity of new dosage form with bacteriophages staphylococcus *in vitro* and *in vivo*

Specific activity and acute toxicity of new drug as gel with bacteriophages staphylococcus were experimentally studied. In the conditions of *in vitro* was determined that the studied preparation did not yield by antimicrobial activity to known preparation of comparison — solution of bacteriophages staphylococcus. In the conditions *in vivo* gel with bacteriophages

staphylococcus by tensiometric and microbiological indices at the model of septic wounds of mice, caused by staphylococcus infection, had therapeutic effect, which exceeded effect of bacteriophages staphylococcus in the solution form. A study of acute toxicity at single skin application in three doses showed an absence of toxic effect of studied preparation.

Ткач Максим Миколайович. Аспірант кафедри біотехнології НфаУ із відривом від виробництва (2006).

Стрельников Леонід Семенович. Д.фарм.н. (1992). Професор (1994). Зав. кафедри біотехнології НФаУ.

Кабачний Геннадій Іванович. К.фарм.н. (1980). Доцент кафедри біотехнології (2008).

Ткачова Оксана Віталіївна. К.фарм.н. (2003). Доцент кафедри фармакоэкономики (2006).

УДК 615.368:615.331:579

Калюжная О.С., Стрельников Л.С., Стрелец О.П.
Національний фармацевтичний університет

Мікробіологічне обґрунтування створення пробіотичного препарату для профілактики та лікування вагінальних дисбіозів

За антагоністичними властивостями пробіотичних штамів у змішаній культурі підібране оптимальне для створення пробіотичного препарату співвідношення штамів *L. plantarum* 8A-P3 та *B. bifidum* I (1:1). Доведено, що молочна кислота забезпечує життєздатність клітин штамів, що досліджуються, та не знижує їх антагоністичні властивості. Отримані дані дають змогу стверджувати про перспективність створення комплексного пробіотичного препарату, що містить штам *L. plantarum* 8A-P3 та *B. bifidum* I (1:1) та молочну кислоту у концентрації, що є нижчою ніж її мінімальна бактерицидна концентрація (МБК) до досліджуваних культур, для профілактики та лікування вагінальних дисбіозів.

На сьогодні основне місце серед всіх гінекологічних патологій займають запальні захворювання репродуктивної системи жінок [1, 2], що пов'язані з розвитком полімікробного інфекційного процесу та можуть бути викликані як специфічними патогенами, так і представниками умовно патогенної мікрофлори. До цього часу основними терапевтичними засобами у боротьбі з урогенітальними інфекціями є антибіотики. У той же час, широке використання антибіотиків і сульфаніламідних препаратів призвело до виникнення ряду небажаних наслідків [3, 4], головними з яких є формування у мікроорганізмів стійкості до цих препаратів, поява перехресної антибіотикорезистентності, а також якісні та кількісні зміни мікрофлори урогенітального тракту, що характерні для розвитку дисбактеріозів.

У зв'язку із вищевикладеним особливого значення набуває створення нових комплексних препаратів для відновлення мікробіоценозу організму та одночасного запобігання або лікування урогенітальних інфекцій. Для корекції мікробіоценозу порожнин і слизових оболонок макроорганізму широко застосовують

пробіотики, які являють собою живі бактерії-симбіонти, що є фізіологічними до нормофлори організму людини [5, 6]. Найчастіше за все в основі таких препаратів лежать „класичні” молочнокислі бактерії (МКБ) — штам *Bifidum* та лактобактерій.

Згідно зі стандартами ВООЗ існують певні вимоги до потенційно пробіотичних штамів [7]. Основною з таких вимог є виявлення антагоністичних властивостей по відношенню до патогенної або умовно патогенної мікрофлори, тобто тієї, із якою нормофлора конкурує під час дисбактеріозів. Переважно антагоністичні властивості зумовлені продукцією молочної кислоти, яка є вагомим, але не єдиним фактором антагонізму. Крім молочної кислоти МКБ можуть продукувати інші органічні кислоти, лізоцим, антибіотичні речовини, бактеріоцини, водню пероксид тощо [5, 8, 9, 10]. У комплексі всі ці фактори створюють потужну систему захисту МКБ від конкуруючих із ними мікроорганізмів.

У попередніх роботах нами було показано високу антагоністичну активність промислових штамів *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 та

Bifidobacterium bifidum I, що складають основу пробіотичних препаратів, по відношенню до умовно патогенних мікроорганізмів [11]. Крім цього, достатньо високі антибіотикорезистентність [12] та ступінь адгезивної активності обумовили використання нами саме цих пробіотичних штамів для створення ефективного інтравагінального лікарського засобу для профілактики та лікування порушень вагінальної нормофлори.

До складу лікарської форми, що розробляється, в якості біологічно активного інгредієнта, що виявляє бактерицидні властивості по відношенню до умовно патогенних та патогенних мікроорганізмів, передбачається введення молочної кислоти, яка являє собою метаболіт обміну речовин макроорганізму та може розглядатися як біологічно безпечний продукт, чим вигідно відрізняється від інших протимікробних речовин. Слід відмітити, що МКБ асимують глікоген, що виробляється клітинами плаского епітелію піхви, та за допомогою анаеробного гліколізу розщеплюють його до ендогенної молочної кислоти, яка і обумовлює кислу реакцію вагінального вмісту [5]. Таким чином, беручи до уваги фізіологічність молочної кислоти до пробіотичних штамів, теоретично можна припустити, що МКБ стійкі до її дії, а одночасне введення до пробіотичного препарату екзогенної молочної кислоти підвищить антагоністичні властивості штамів, що досліджуються.

Метою нашої роботи було дослідження стійкості пробіотичних штамів *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I, що є перспективними для створення комплексного інтравагінального пробіотика, до молочної кислоти; визначення антагоністичних властивостей пробіотичних штамів у змішаній культурі та порівняти їх із властивостями монокультур із метою підбору оптимального співвідношення штамів для конструювання нового пробіотичного препарату; вивчення впливу молочної кислоти на антагоністичну активність і виживаємість клітин штамів, що досліджуються, в моно- та змішаній культурі.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були пробіотичні штами *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I.

Антагоністичну активність штамів МКБ вивчали із використанням референс-штамів умовно патогенних мікроорганізмів: *Escherichia coli* УКМ (Українська колекція мікроорганізмів) В-906 (АТСС 25922 (F-50)), *Staphylococcus aureus* УКМ В-904 (АТСС 25923 (F-49)), *Bacillus subtilis* УКМ В-901 (АТСС 6633), *Proteus vulgaris* УКМ В-905 (АТСС 6896), *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-907 (АТСС 27853 (F-51)), *Candida albicans* УКМ Y-1918 (АТСС 885-653).

Із метою дослідження протимікробної активності молочної кислоти використовували метод двократних серійних розведень у рідкому живильному середовищі [13], за допомогою якого визначили мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) та мінімальну бактерицидну концентрацію (МБК).

Властивості змішаної культури досліджуваних штамів *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I вивчали у співвідношеннях 1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1. Висівну дозу мікробної зависі визначали за стандартом каламутності на 5 од. Контроль числа життєздатних клітин (КУО/мл) проводили методом серійних розведень із подальшим висіванням на густе живильне середовище.

Для вивчення впливу молочної кислоти на моно- та змішану культуру пробіотичних штамів мікроорганізми культивували у м'ясопептонному бульйоні (МПБ) із додаванням молочної кислоти у концентрації, що є меншою ніж попередньо визначена для них МІК, протягом 48 год при температурі (37 ± 1) °С. Після культивування з молочною кислотою визначали антагоністичну активність і кількість живих клітин у культурах, що досліджуються.

Антагоністичну активність вивчали за модифікованою методикою А.А. Ленцнера [14]. Із цієї метою отриману дводобову культуру висівали штрихом бактеріологічною петлею по діаметру чашок Петрі із середовищем МРС-5. Після інкубації протягом 4 дб при температурі (37 ± 1) °С на поверхню середовища підсівали тест-культури, попередньо вирощені протягом 6 год на МПБ. Висівання виконували петлею штрихом у напрямку від зони росту досліджуваної культури, не торкаючись до неї та перпендикулярно їй.

Урахування результатів проводили за добою інкубування при температурі (37 ± 1) °С за ве-

Таблиця 1

Протимікробна активність молочної кислоти по відношенню до пробіотичних штамів

Досліджуваний штам	Кількісні показники протимікробної активності молочної кислоти, мг/мл	
	МІК	МБК
<i>L. plantarum</i> 8R-A3	0.0743	0.0743
<i>B. bifidum</i> I	0.0186	0.0372

личиною зони відсутності росту тест-культури. Контролем росту тест-культур є їхнє паралельне висівання на чашки із МРС-5 без висівання моно- або змішаної пробіотичної культури.

Для визначення числа живих клітин пробіотичних мікроорганізмів при культивуванні з молочною кислотою до певної кількості рідкого живильного середовища вносили вихідну завись пробіотичного штаму з відомим числом життєздатних клітин та молочну кислоту у концентрації, що є меншою ніж попередньо визначена для них МБК. Для контролю пробіотичні культури вирощували за тих самих умов, але без додавання молочної кислоти. Після інкубації протягом 48 год з отриманої у такий спосіб культури по 1 мл завись переносили до пробірок, що містили по 9 мл 0.9 % розчину натрію хлориду, та готували ряд послідовних десятикратних розведень - від 10^{-1} до 10^{-7} . З останніх розведень висівали по 0.1 мл мікробної завись на густе живильне середовище. Після 48 год інкубації при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ підраховували колонії, що вирости, обчислювали вміст живих бактерій і порівнювали із контролем.

Усі досліди проводили у п'яти повторностях. Статистичну обробку здійснювали традиційними методами варіаційної статистики. Середні арифметичні значення та їх довірчі інтервали визначали для рівня вірогідності 95 %.

Результати досліджень та їх обговорення

Як відомо із даних літератури, молочна кислота виявляє деякий антимікробний потенціал, тому для доведення можливості її введення до складу лікарської форми, що містить пробіотичні культури, необхідно вивчити вплив молочної кислоти на штами *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I, що є перспективними для створен-

ня пробіотичного препарату. Результати проведених досліджень щодо визначення впливу молочної кислоти на штами *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I наведено в Табл. 1.

Дані, наведені в Табл. 1, свідчать про незначний протимікробний вплив молочної кислоти на пробіотичні культури. Тобто, введення молочної кислоти до складу пробіотичного препарату у концентрації, що є меншою ніж визначена для *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I МБК, можливе.

Виходячи з того, що антагоністична активність є одним з основних критеріїв відбору пробіотичних штамів, наступним етапом наших досліджень був підбір оптимального співвідношення культур *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I для конструювання пробіотичного препарату за результатами вивчення антагоністичних властивостей змішаної культури.

Результати досліджень щодо підбору співвідношення культур *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I у пробіотичному препараті, що розробляється, наведено у Табл. 2.

Згідно даних Табл. 2, де наведені зони затримки росту референс-штамів пробіотичними штамами у різних співвідношеннях, штаму *L. plantarum* 8R-A3 у монокультурі виявляє більш виражений антагонізм ніж *B. bifidum* I. При цьому у змішаній культурі зони затримки росту збільшились при порівнянні з контрольними монокультурами.

При співвідношеннях 1:2, 1:4, 2:1 спостерігається тенденція до зменшення зон затримки росту референс-штамів при порівнянні зі співвідношенням 1:1. Співвідношення 4:1 є менш раціональним у порівнянні зі співвідношенням 1:1 із точки зору використання у готовій лікарській формі. Таким чином, можна зробити ви-

Таблиця 2

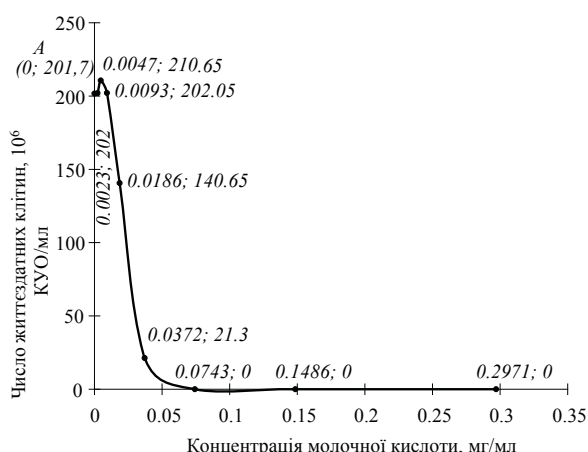
Антагоністична активність штамів *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I, що взяті у різних співвідношеннях

Співвідношення <i>L. plantarum</i> : <i>B. bifidum</i>	Зона затримки росту тест-культур, (M±m) мм					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1:1	23.0±0.79	27.6±0.61	22.4±0.99	18.4±0.99	22.2±0.50	40.8±0.50
1:2	21.4±0.99*	25.6±0.61*	21.0±0.79***	14.2±0.50***	20.6±0.61*	39.8±0.93***
1:4	19.6±0.61***	24.8±0.50***	18.4±0.61*	13.0±0.79***	18.8±0.50***	35.8±0.50*
2:1	22.4±0.61	26.4±0.99*	21.8±0.50**	18.2±0.93**	20.8±0.50*	40.2±0.50***
4:1	22.8±0.93**	28.6±0.99***	23.4±0.61***	20.6±0.99***	22.2±0.50**	41.8±0.50***
контроль						
<i>L. plantarum</i>	21.8±0.50*	25.6±0.61*	17.8±0.50*	16.4±0.99*	20.8±0.50*	36.4±0.61*
<i>B. bifidum</i>	9.2±1.45*	11.8±0.50*	9.0±0.79*	8.8±0.50*	10.8±0.50*	-

Примітки:

- * — відхилення вірогідно відносно співвідношення 1:1, p<0.05;
- ** — відхилення вірогідно відносно контролю, p<0.05;
- — відсутність зон затримки росту тест-культур.

Рисунок 1



0 — менше 5 КУО/мл.

Залежність життєздатності клітин штаму *L. plantarum* 8R-A3 від концентрації молочної кислоти

сновок, що змішана культура *L. plantarum* та *B. bifidum* у співвідношенні 1:1 найбільш оптимальна для введення до складу пробіотичного препарату, що розробляється, тому у подальших експериментах ми використовували саме це співвідношення.

Для подальшої роботи із розробки пробіотичного препарату для профілактики та лікування вагінальних дисбіозів необхідно було вивчити показники антагоністичної активності моно- та змішаної культур *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I після культивування у звичайних умовах та у присутності молочної кислоти. Як і в попередньому експерименті, антагоністич-

ні властивості оцінювали за зонами затримки росту референс-штамів, що були визначені методом перпендикулярних штрихів. Результати досліджень наведено у Табл. 3.

Результати, наведені в Табл. 3, свідчать про збереження достатнього рівня антагоністичних властивостей моно- та змішаної культур (співвідношення 1:1) *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I при культивування їх з молочною кислотою, що ще раз доводить можливість її введення до лікарської форми, що розробляється.

Ростові характеристики культур *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I при спільному культивуванні з молочною кислотою оцінювали за кількістю життєздатних клітин після інкубування штамів із певними концентраціями молочної кислоти. Проаналізувавши отримані результати, нами були побудовані криві росту культур, де по осі ординат відкладено число життєздатних клітин в одиниці об'єму, по осі абсцис — концентрації молочної кислоти. За побудованими графіками було проведено порівняння залежності життєздатності клітин штамі, що досліджуються, від концентрації молочної кислоти.

При збільшенні концентрації молочної кислоти до 0,0743 мг/мл, що відповідає її МБК по відношенню до цього штаму, та вище (Рис. 1) число життєздатних клітин штаму *L. plantarum* 8R-A3 суттєво знижується і становить менше 5 КУО/мл; при досягненні концентрації молочної кислоти 0,0186 мг/мл число життєздатних клітин суттєво не змінюється. Згідно з аналізом ростових характеристик штаму *B. bifidum* I (Рис. 2) число клітин суттєво знижується і становить менше 5 КУО/мл при концентрації мо-

Таблиця 3

Антагоністична активність моно- та змішаної культур *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum* I після культивування з молочною кислотою

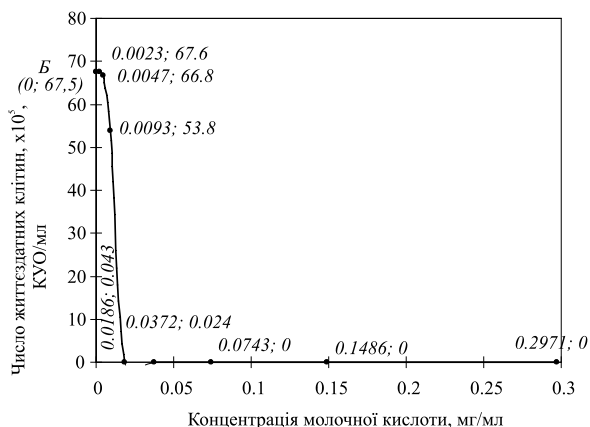
Досліджувана культура	Зона затримки росту тест-культур, (M±m) мм					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>L. plantarum</i> + молочна кислота	21.6±0.81	26.8±0.52	18.6±0.63	16.6±0.81	20.6±0.81	38.4±0.81
<i>B. bifidum</i> + молочна кислота	9.8±0.52	11.4±0.81	9.2±0.52	9.4±0.81	10.2±0.52	—
<i>L. plantarum</i> + <i>B. bifidum</i> (1:1) + молочна кислота	23.2±0.52	26.6±0.81	23.8±0.52	18.4±0.81	21.4±0.81	43.8±0.52
контроль						
<i>L. plantarum</i>	21.8±0.50	25.6±0.61	17.8±0.50	16.4±0.99	20.8±0.50	36.4±0.61
<i>B. bifidum</i>	9.2±1.45	11.8±0.50	9.0±0.79	8.8±0.50	10.8±0.50	—
<i>L. plantarum</i> + <i>B. bifidum</i> (1:1)	23.0±0.79	27.6±0.61	22.4±0.99	18.4±0.99	22.2±0.50	40.8±0.50

Примітки:

* — відхилення вірогідно відносно відповідного контролю, $p < 0.05$;

— — відсутність зон затримки росту тест-культур.

Рисунок 2



0 — менше 5 КУО/мл.

Залежність життєздатності клітин штаму *B. bifidum I* від концентрації молочної кислоти

лочної кислоти 0.0743 мг/мл; при концентрації нижче 0.0093 мг/мл число життєздатних клітин практично не змінюється. Порівняння числа життєздатних клітин штамів *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum I* після культивування з молочною кислотою у концентрації, нижчою за її МБК до відповідного штаму, з числом клітин після культивування без молочної кислоти (точка А на Рис. 1 і точка Б на Рис. 2) показало відсутність суттєвої різниці між ними. Таким чином, можна стверджувати про можливість використання молочної кислоти при створенні пробіотичного препарату для лікування урогенітальних інфекцій.

Висновки

Досліджено дію молочної кислоти на пробіотичні культури *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum I*. Здійснено порівняння антагоністичної активності штамів *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum I* у монокультурі та у змішаній культурі у співвідношеннях 1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1. Показано, що співвідношення пробіотичних культур 1:1 є оптимальним для створення лікарської форми.

Результати досліджень доводять перспективність створення комплексного пробіотичного препарату, що містить штами *L. plantarum* 8R-A3 та *B. bifidum I* у співвідношенні 1:1 та молочну кислоту у концентрації, що є нижчою ніж її МБК до штамів, що досліджуються.

ЛІТЕРАТУРА

1. Факторы персистенции микрофлоры при воспалительных заболеваниях внутренних женских половых органов / О.В. Бухарин, О.Д. Константинова, С.В. Черкасов, Е.А. Кремлева // Вестник Российской ассоциации акушеров-гинекологов. — 1998. - № 3. - С. 62 — 65.
 2. Кулініч Т.І. Клініко-патогенетичні аспекти комплексного лікування фонових процесів шийки матки: Автореф. дис. ... к.мед.н. — Київ, 2005. — 23 с.

3. Барбоса Т. М. Использование антибиотиков и резистентность: что скрывается в тени? / Т.М. Барбоса, С.Б. Леви // Клиническая антибиотикотерапия. — 2001. — № 3 (11). — С. 30 — 32.
 4. Березняков И. Г. Современные принципы разумного применения антибиотиков / И.Г. Березняков // Лікування та діагностика. — 2004. — № 1. — С. 11 — 22.
 5. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления. — К.: Эксперт ЛТД, 2005. — 361 с.
 6. Шевелева С.А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса / С.А. Шевелева // Вопросы питания. — 1999. - № 2. — С. 32-40.
 7. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов / В.В. Смирнов, Н.К. Коваленко, В.С. Подгорский, И.Б. Сорокулова // Мікробіол. журн. — 2002. — Т. 64, № 4. — С. 62-80.
 8. Блинкова Л. П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления / Л.П. Блинкова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2003. - № 3. — С. 109 — 113.
 9. Коваленко Н.К. Бактериоциногенная и лизоцимсинтезирующая активность молочнокислых бактерий / Н.К. Коваленко, Л.Н. Немировская, С.А. Касумова // Мікробіол. журн. — 1999. — Т. 61, № 6. — С. 42 — 50.
 10. Ратникова И.А. Идентификация антибиотических веществ молочнокислых бактерий / И.А. Ратникова, Н.Н. Гаврилова, Н.Н. Колоколова // Биотехнология. — 1995. — № 5/6. — С. 19 — 20.
 11. Калюжная О.С. До питання розробки лікарських засобів із нормобіотиками. Вивчення антагоністичної активності лактобактерій / О.С. Калюжная, Л.С. Стрельников, О.П. Стрілець // Фармаком. — 2008. - № 1. — С. 46 — 49.
 12. Калюжная О.С. Вивчення антибіотикорезистентності пробіотичних штамів до антибіотиків та протигрибкових препаратів / О.С. Калюжная, Л.С. Стрельников, О.П. Стрілець // Запорожский медицинский журнал. — 2008. - № 5. — С. 46 — 49.
 13. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів : Метод. рекомендації / Волянський Ю.А., Гриценко І. С., Широбоков В. П. та ін. — Київ, 2004. — 39 с.
 14. Руководство по вакцинному и сывороточному делу / Под ред. П.Н. Бургасова. — М.: Медицина, 1978. — 438 с.

Резюме

Калюжная О.С., Стрельников Л.С., Стрилец О.П.

Микробиологическое обоснование создания пробиотического препарата для профилактики и лечения вагинальных дисбиозов

По антагонистическим свойствам пробиотических штаммов в смешанной культуре подобрано оптимальное для создания пробиотического препарата соотношение штаммов *L. plantarum* 8A-P3 и *B. bifidum I* (1:1). Доказано, что молочная кислота обеспечивает жизнеспособность клеток исследуемых штаммов и повышает их антагонистические свойства. Полученные данные дают возможность говорить о перспективности создания комплексного пробиотического препарата, содержащего штаммы *L. plantarum* 8A-P3 и *B. bifidum I* (1:1) и молочную кислоту в концентрации ниже чем ее МБК к исследуемым штаммам для профилактики и лечения вагинальных дисбиозов.

Summary

Kalyuzhnaya O.S., Strelnikov L.S., Strilets O.P.

Microbiological foundation of the development of probiotic preparation for the prevention and treatment of vaginal dysbacteriosis

According antagonistic properties of probiotic strains in mixed culture was selected optimal for the development of

probiotic preparation the ratio of strains *L. plantarum* 8A-P3 and *B. bifidum* I (1:1). It was established that lactic acid provided viability of studied strains cells and did not reduced their antagonistic properties. Obtained data gave an opportunity to claim the availability of the development of complex probiotic preparation with strains *L. plantarum* 8A-P3 and *B. bifidum* I (1:1) strains and lactic acid in the concentration, which has been lower than its minimum bactericidal concentration against to studied cultures, for the prevention and treatment of vaginal dysbacteriosis.

Калюжная Ольга Сергіївна. Аспірант кафедри біотехнології НФаУ із відривом від виробництва (2006).

Стрельников Леонід Семенович. Д.фарм.н. (1992). Професор (1994). Зав. кафедри біотехнології НФаУ.

Стрілець Оксана Петрівна. К.фарм.н. (2001). Доцент кафедри біотехнології (2004).

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості

УДК 615.015.32:615.11(477)

Бовтенко В.А., Е.П. Безуглая Е.П., Ляпунов Н.А., Столпер Ю.М.
Государственно предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Валидация методик анализа препарата «Сальбутамол, ингаляция под давлением, 100 мкг/доза»

Рассмотрена фармакопейная методика определения примесей методом ВЭЖХ в субстанции сальбутамола сульфата и показаны ее особенности при использовании разных хроматографических колонок. Для анализа препарата «Сальбутамол, ингаляция под давлением, 100 мкг/доза» использована фармакопейная методика количественного определения сальбутамола сульфата методом ВЭЖХ и проведена ее валидация по следующим характеристикам: специфичность, правильность, прецизионность, линейность, диапазон применения. На основании расчета полной неопределенности показано, что методика соответствует критериям пригодности для количественного определения сальбутамола сульфата в препарате и будет давать корректные результаты в других лабораториях. Валидированная методика количественного определения сальбутамола применена при испытаниях «Доза мелкодисперсных частиц», «Однородность дозы» и «Количественное определение». Показано соответствие разработанного препарата фармакопейным требованиям по этим показателям. Для определения неспецифических примесей и примеси сальбутамола кетона методом ВЭЖХ в препарате использованы две соответствующие фармакопейные методики и проведена их валидация по характеристикам специфичность и предел обнаружения.

Сальбутамол, ингаляция (аэрозоль) под давлением, 100 мкг/доза, отнесен Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) к основным лекарственным средствам [1]. От применения этого препарата зависит не просто купирование приступа удушья, но очень часто и жизнь больного. В связи с этим требования к качеству этого лекарственного средства, выпускаемого разными фирмами-производителями, совершенствуются и ужесточаются; причем это касается как субстанции сальбутамола сульфата [2], так и самой лекарственной формы, что находит отражение в общих статьях и монографиях ведущих фармакопей [3, 4, 5]. В первую очередь, это относится к испытаниям, коррелирующим с эффективностью терапевтического действия препарата (количественное определение сальбутамола в одной дозе, однородность дозирования, осаждение дозы мелкодисперсных частиц в нижней камере устройства А) и безопасностью (идентификация, сопутствующие примеси, микробиологическая чистота).

С одной стороны, фармакопейные методики анализа с каждым новым изданием Фармакопей становятся более сложными и многооб-

разными, с другой стороны, аналитические методики, включенные в фармакопейные монографии, валидированы. Однако эти методики разработаны без учета состава вспомогательных веществ, технологии, упаковки, а также конкретного аналитического оборудования. Фармакопейные методики, в лучшем случае, могут использоваться для контроля качества лекарственных препаратов только после верификации, то есть подтверждения, что конкретный состав не приводит к ухудшению правильности, линейности или прецизионности методики, а вспомогательные вещества не влияют на ее специфичность. Нельзя без экспериментального подтверждения предполагать, что фармакопейная методика или испытание будут давать корректные результаты для препарата с иным составом, чем тот, который использовался для валидации фармакопейных методик и испытаний [6, 7]. Для препаратов-генериков часто требуется модификация фармакопейных методик и, соответственно, их валидация в необходимом объеме [8]. Фактически использование фармакопейных методик анализа для конкретного препарата становится актуаль-

ной задачей, которая требует правильного научного решения.

Нами был разработан препарат-генерик «Сальбутамол, ингаляция под давлением, 100 мкг/доза», который содержит сальбутамол сульфат в виде суспензии, липофильное поверхностно-активное вещество (ПАВ) олеиловый спирт, этанол (96 %) для суспендирования сальбутамол сульфата, и экологически безопасный пропеллент — хладон 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан). В основу методик анализа препарата с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) были положены фармакопейные аналитические методики [5].

Целью настоящей работы является представление некоторых результатов испытаний качества субстанции сальбутамол сульфата и разработанного препарата с использованием фармакопейных методик, а также результатов их валидации для разработанного препарата.

Объекты и методы исследований

В качестве объектов исследований использовали разработанный нами препарат «Сальбутамол, ингаляция под давлением, 100 мкг/доза» и его аналог — инновационный препарат «Вентолин Эвохалер, аэрозоль для ингаляций, 100 мкг/доза» («GlaxoSmithKline»), которые содержат 100 мкг сальбутамол сульфата в одной дозе (в пересчете на сальбутамол), а в качестве пропеллента хладон 134a [9]. Препарат по 200 доз (по 12 мл) помещали в баллоны алюминиевые моноблочные фирмы «Linhardt GmbH & Co KG» (Германия) (типа D 22.0 DDG – 28) с внутренней защитой, герметизированные дозирующим клапаном типа 20 DR 376/50/0-PT (номинальная доза 50 мкл) и снабженные насадкой-ингалятором с защитным колпачком типа V05.1227 + V20.94 производства фирмы «Coster Technologie Speciali S.p.a.» (Италия).

В работе использовали: микронизированные субстанции сальбутамол сульфата производства фирмы «Vamsi Labs Ltd» или «FDC Limited» (Индия), соответствующие требованиям Европейской Фармакопеи [2]; стандартные образцы (СО) сальбутамол сульфата (EP CRS); сальбутамол (BP CRS); сальбутамол примеси В (EP CRS); сальбутамол примеси D (EP CRS); сальбутамол примеси G (EP CRS); сальбутамол примеси F (EP CRS); сальбутамол примеси I (EP CRS); сальбутамол примеси кетона (BP CRS); 2-трет-бутиламино-1-(4-гидрокси-3-метилфенил)этанол сульфат (BP CRS).

Аналитические испытания методом ВЭЖХ проводили на хроматографе фирмы «Shimadzu»

следующей комплектации: насос LC-20AD, автосамплер SIL-20A, детектор SPD-20AV, термостат CTO-20AC, системный контроллер CBM-20Alite, смеситель потока подвижной фазы высокого давления. Отбор проб для теста «Доза мелкодисперсных частиц» проводили с использованием стеклянного импинджера (устройство А) [4] и оборудования фирмы «Egweka»: вакуумный насос типа HVP 1000, измеритель потока воздуха тип DFM 2 по установленной методике [4, 5].

Для оценки качества субстанции сальбутамол сульфата анализ проводили по методикам, описанным в монографии «Salbutamol sulphate» [2]. При проведении теста на содержание посторонних примесей использовали хроматографические колонки, заполненные октилсиликагелем, и для проверки робастности методики испытание проводили на двух хроматографических колонках размером (150×4.6) мм, заполненных сорбентом Kromasil C8 (фирма «Dr. Maische») и Kromasil 100 C8 (фирма «BIA Separation») с размером частиц 5 мкм.

Количественное определение сальбутамол при испытаниях «Доза мелкодисперсных частиц», «Однородность дозы» и «Количественное содержание сальбутамол в одной дозе» проводили при одинаковой конфигурации хроматографической системы [5]: хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером (250×4.6) мм, заполненная сорбентом Hypersil ODS с размером частиц 5 мкм производства фирмы «Supelco Inc.»; подвижная фаза: метанол Р — 0.1 % раствор аммония ацетата (800:225); скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин; детектирование при длине волны 276 нм; температура колонки 30 °С.

Контроль содержания посторонних примесей проводили в следующих условиях [5]: хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером (150×4.6) мм, заполненная сорбентом Kromasil 100 C8 с размером частиц 5 мкм производства фирмы «BIA Separation»; подвижная фаза: ацетонитрил для хроматографии Р — фосфатный буферный раствор рН 3.65, содержащий 2.87 г/л натрия гептансульфоната моногидрата (22:78); скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин; детектирование при длине волны 276 нм; температура колонки 30 °С. Пригодность хроматографической системы: относительное стандартное отклонение величин площадей пиков сальбутамол для 5 повторных хроматограмм раствора сравнения не должно превышать $RSD_{max} = 2.37$.

Содержание сальбутамол кетона определяли в следующих условиях [5]: хроматографиче-

ская колонка из нержавеющей стали размером (250×4.60) мм, заполненная сорбентом Kromasil C8 с размером частиц 5 мкм производства фирмы «Supelco Inc.»; детектирование при длине волны 276 нм; температура колонки 30 °С; подвижная фаза А: смесь 2-пропанол Р — 0.1 М раствор аммония ацетата Р (1.5:98.5), доведенная до рН 4.5 кислотой уксусной ледяной Р; подвижная фаза В: 2-пропанол Р; скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин в градиентном режиме в следующих условиях: 0.5 мин изократический режим (А — 100 %; В — 0 %); 5-20 мин линейный градиент (А — 100-86 %; В — 0-14 %); 20-30 мин изократический режим (А — 86 %; В — 14 %) с последующей регенерацией колонки.

Используемые методики предложены для оценки субстанции сальбутамола сульфата и его препаратов [2, 5] с указанием требований к пригодности хроматографической системы, а также сходимости результатов анализа.

Экспериментальная часть

Примеси в субстанции сальбутамола сульфата

В субстанции сальбутамола сульфата контролируют как специфические, так и неспецифические примеси [2]. Для этого используют стандартные образцы примесей В, D, F, G и I [2]. Нормирование содержания примесей D, F, G проводят по сравнению с соответствующими стандартными образцами (для каждой примеси не более 0.3 %). Другие примеси (А, В, С, Е, Н, I) идентифицируют по относительному времени удерживания и площадь пика каждой из этих примесей не должна превышать 0.3 % от пика сальбутамола сульфата EP CRS на хроматограммах раствора сравнения (а). Суммарное содержание примесей не должно превышать 1.0 %. В расчет не принимают пики, площадь которых в 6 раз меньше площади пика сальбу-

тамола на хроматограммах раствора сравнения (а) (менее 0.05 %).

Хроматограмму раствора сравнения (b) используют для идентификации на хроматограмме испытуемого раствора пика примеси I, имеющего большое относительное время удерживания.

На Рис. 1 и 2 приведены типичные хроматограммы раствора сравнения (а) и раствора сравнения (b), полученные с использованием хроматографической колонки фирмы «Dr. Maische», а в Табл. 1 — данные о времени удерживания (*t*) сальбутамола и относительном времени удерживания (*Rt*) примесей сальбутамола, полученные экспериментально на двух колонках и приведенные в фармакопейной монографии [2].

Из приведенных на Рис. 1 и 2 хроматограмм видно, что система имеет достаточную разделительную способность. Однако из данных Табл. 1, видно, что время удерживания сальбутамола при использовании обеих колонок оказывается отличным от времени, указанного в фармакопейной монографии, в 1.66 раза и в 2.21 раза. Чем больше время удерживания примеси, тем в общем больше относительное время удерживания по сравнению с относительным временем удерживания, указанным в фармакопейной монографии. Соответственно этому должны сдвигаться и относительные времена удерживания других примесей, которые не используют для приготовления раствора сравнения. Исключение составляет *Rt* примеси I при использовании колонки фирмы «Dr. Maische». В то же время *Rt* примеси I при использовании колонки производства фирмы «BIA Separation» составляет 26.58, что, соответственно, увеличивает время хроматографирования (более 25 времен удерживания сальбутамола, указанных в фармакопейной монографии) [2], что необходимо учитывать при проведении анализа.

Таблица 1

Времена удерживания (*t*) пика сальбутамола сульфата и относительные времена удерживания (*Rt*) пиков примесей сальбутамола

Вещество, дающее пик	<i>t</i> (мин) или <i>Rt</i>		
	монография EP	«Dr. Maische»	«BIA Separation»
сальбутамол	около 1.9 мин	3.150 мин	4.201 мин
примесь В	около 1.3	1.39	1.39
примесь А	около 1.7		
примесь С	около 2.0		
примесь D	около 2.7	2.88	2.90
примесь Н	около 3.0		
примесь Е	около 3.1		
примесь G	около 4.1	4.76	4.78
примесь F	около 6.2	7.74	7.80
примесь I	около 23.2	19.53	26.58

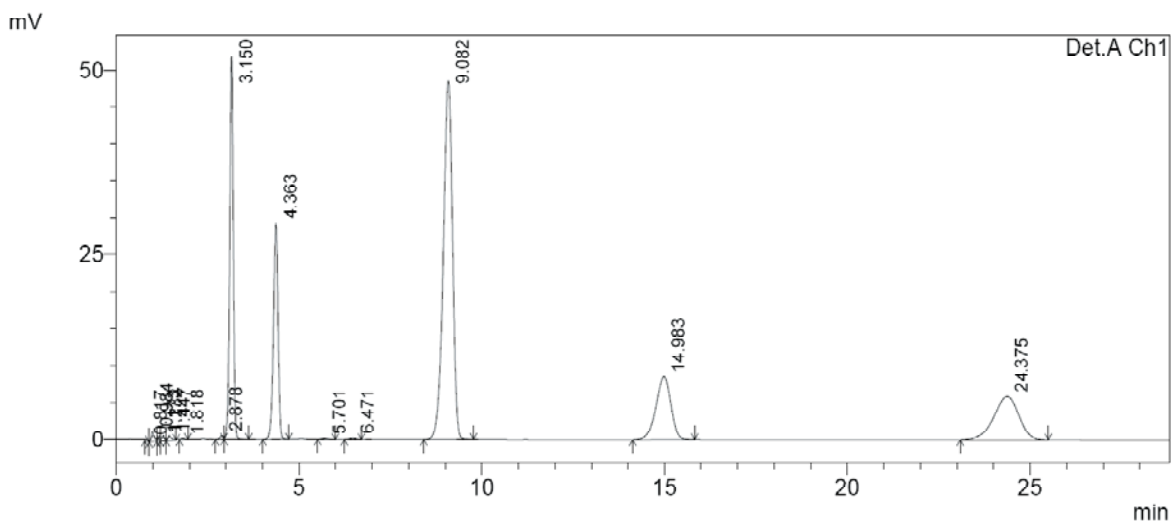
В исследованных субстанциях сальбутамола сульфата содержание примесей не превышало нормы и суммарно составляло менее 0.5 %.

Определение сальбутамола сульфата в препарате

Определение содержания сальбутамола сульфата в пробе проводят при проведении тестов «Доза мелкодисперсных частиц», «Однородность дозы» и «Количественное определение». Кроме того, проводят идентификацию сальбутамола сульфата в препарате методом ВЭЖХ при количественном определении этого вещества по

совпадению времен удерживания основного пика на хроматограммах испытуемого раствора препарата с пиком СО сальбутамола сульфата на хроматограммах раствора сравнения. Для аналитических методик, используемых для количественного определения, должны быть продемонстрированы такие валидационные характеристики, как специфичность, правильность, прецизионность, линейность и диапазон применения, а для методики идентификации — специфичность [8, 10].

Рисунок 1

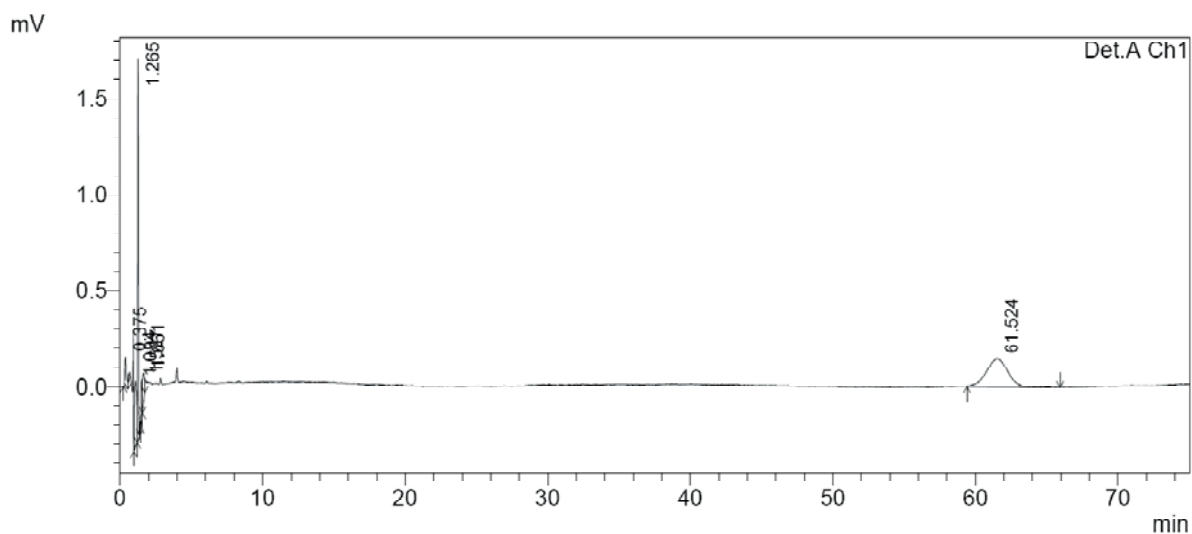


— время удерживания сальбутамола 3.150 мин; примесь В, $R_t = 1.39$; примесь D, $R_t = 2.88$; примесь G, $R_t = 4.76$; примесь F, $R_t = 7.74$;

— колонка производства фирмы «Dr. Maische».

Хроматограмма раствора сравнения (а)

Рисунок 2



— время удерживания сальбутамола 3.150 мин; примесь I, $R_t = 19.53$);

— колонка производства фирмы «Dr. Maische».

Хроматограмма раствора сравнения (b)

Валидацию методик идентификации и количественного определения сальбутамола методом ВЭЖХ проводили в соответствии с установленными требованиями [8, 10] на модельных образцах, полученных в лабораторных условиях из компонентов препарата, которые соответствуют требованиям нормативных документов для входного контроля качества [2, 11, 12].

Специфичность. Хроматограммы, подтверждающие специфичность, представлены на Рис. 3.

Специфичность методики подтверждается тем, что:

- время удерживания сальбутамола на хроматограммах испытуемого раствора препарата совпадает со временем удерживания сальбутамола на хроматограммах раствора сравнения сальбутамола (BP CRS) с точностью менее 0.1 %;
- коэффициент разделения пиков сальбутамола и 2-трет-бутиламино-1-(4-гидрокси-3-метилфенил)этанол сульфата (BP CRS) (близкого по структуре вещества) на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы составляет около 2;

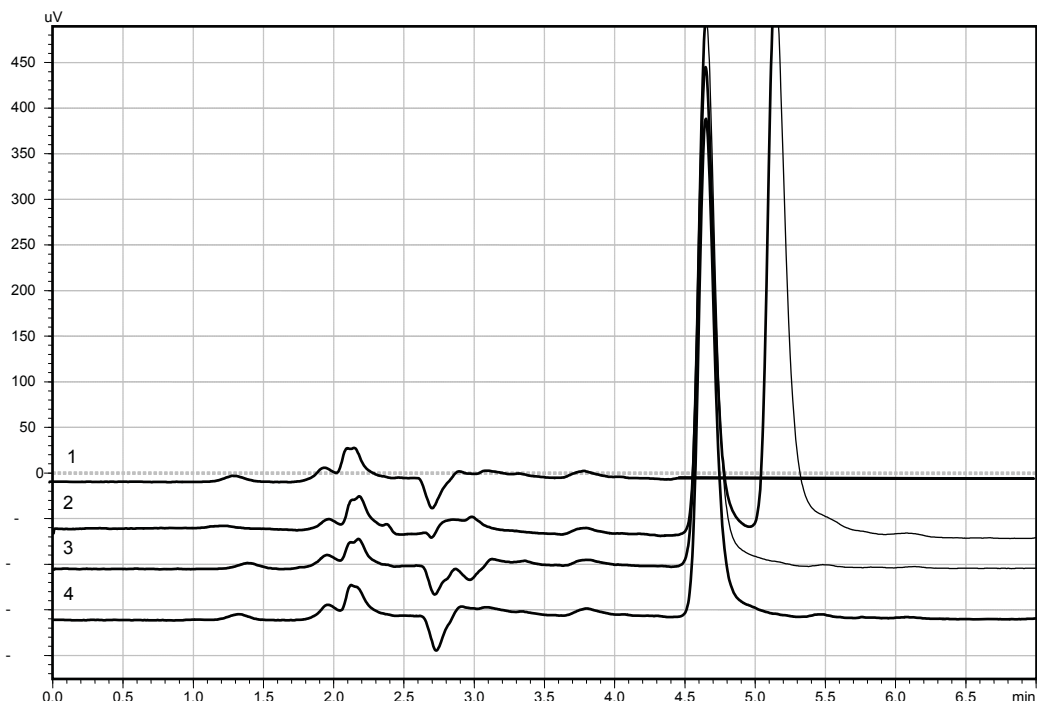
— компоненты основы не влияют на результаты анализа, то есть, условия хроматографирования позволяют разделить пик сальбутамола и других веществ («плацебо»), входящих в состав препарата (Рис. 3).

Правильность, прецизионность (сходимость), линейность и диапазон применения. Количественное определение сальбутамола проводят при проведении тестов: «Доза мелкодисперсных частиц», где предел содержания сальбутамола в определяется 35 % от номинального содержания; «Однородность дозы», где границы содержания сальбутамола от 75 % до 125 % от номинального содержания, и «Количественное определение» — от 90 % до 110 % от номинального содержания. Таким образом, характеристики правильности и прецизионности исследовались на модельных растворах препарата с концентрациями сальбутамола, которые находятся в пределах от 25 % до 145 % содержания по отношению к номинальному значению, что соответствует диапазону применения данной методики.

Приготовление модельных смесей.

24 мг сальбутамола сульфата помещают во взвешенную мерную колбу вместимостью

Рисунок 3



сверху вниз:

- хроматограмма раствора плацебо;
- хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы;
- хроматограмма раствора сравнения (раствора СО сальбутамола);
- хроматограмма раствора препарата.

Хроматограммы, полученные в условиях проведения испытания «Количественное определение»

100 мл, доводят объем раствора метанолом Р до метки, снова взвешивают и перемешивают (200 мкг/мл сальбутамола) (исходный раствор). Во взвешенные мерные колбы вместимостью 100 мл (класс А) помещают аликвоту исходного раствора (от 1.25 мл до 7.25 мл), снова взвешивают, прибавляют по 50 мкл плацебо (раствор олеилового спирта в 96 % спирте), доводят объем раствора метанолом Р до метки, снова взвешивают и перемешивают (от 2.5 мкг/мл до 14.5 мкг/мл). Далее проводят количественное определение в соответствии с установленной фармакопейной методикой [5].

Результаты расчетов метрологических характеристик методики при измерении концентраций сальбутамола приведены в Табл. 2.

(Масса СО сальбутамола $m = 19.58$ мг. Концентрация раствора сравнения $c = 9.79$ мкг/мл).

Из данных, приведенных в Табл. 2, следует, что для сальбутамола методика анализа характеризуется достаточной правильностью и прецизионностью во всем диапазоне концентраций (от 25 % до 145 %) и является корректной. Как свидетельствуют данные Табл. 2, в диапазоне концентраций сальбутамола от 25 % до 145 % по отношению к номинальной концентрации методика не имеет значимой систематической погрешности.

Линейность методики также исследовали в диапазоне концентраций сальбутамола от 25 %

до 145 % по отношению к номинальному значению. Установлено, что требования к параметрам линейной зависимости выполняются, то есть, линейность методики определения сальбутамола подтверждается в диапазоне концентраций от 25 % до 145 % от номинального значения.

Для модельных растворов методом наименьших квадратов рассчитывают линейную зависимость:

$$(S_i/S_{st}) \times 100 = b \times (C_i/C_{st}) \times 100 + a,$$

$$Y_i = b \times X_i + a,$$

Для оценки линейности методики используют следующие критерии.

Требования к свободному члену a :

1. Критерий статистической незначимости

Свободный член a должен быть статистически неотличим от нуля, то есть не должен превышать свой доверительный интервал:

$$|a| \leq \Delta_A = t(95\%, n - 2) \cdot s_a = 1.895 \cdot s_a$$

где:

s_a — стандартное отклонение для отрезка, который отсекается на оси ординат (для рассчитанной регрессионной прямой).

2. Критерий практической незначимости

Если первый критерий не выполняется, используют критерий практической незначимости для свободного члена. Вклад свободного члена в неопределенность результата анализа должен

Таблица 2

Результаты анализа модельных смесей препарата, содержащих от 25 % до 145 % сальбутамола, и их статистическая обработка

№ р-ра	Введено в % от концентрации раствора сравнения ($X_{i, \text{факт.}}$ %)	Найдено в % к концентрации раствора сравнения (Y_{it} %)	Найдено в % к введенному $Z_i = 100 \times (Y_i / X_i)$
1	25.53	25.41	99.53
2	53.29	53.30	100.02
3	77.47	75.88	97.95
4	87.28	86.38	98.97
5	93.81	93.69	99.87
6	100.43	100.11	99.68
7	109.70	109.28	99.62
8	120.76	119.81	99.21
9	147.85	149.60	101.18
$RSD_Y = 39.89$			среднее, Z_{cp} % =
			99.56
относительное стандартное отклонение, s_z % =			0.8684
относительный доверительный интервал			
$\Delta, \% = t(95\%, 8) \times s_z = 2.3060 \times s_z =$			2.0024
критическое значение для сходимости результатов $\Delta, \% =$			3.6000
систематическая погрешность $\delta = Z_{cp} - 100 =$			0.4408
критерий незначимости систематической погрешности			
1) $\delta \leq \Delta / 3 = 3.2 / 3 = 1.02$			выполняется
2) если не выполняется 1), то $\delta \leq 3.2$			выполняется
общий вывод о методике			корректна

быть незначимым по сравнению с максимально допустимой неопределенностью [8, 10]:

$$|a| \leq \frac{0.32 \cdot \Delta_{As} (\%) }{1 - (25/100)}$$

$$|a| \leq 1.37$$

Требования к *относительному остаточному стандартному отклонению* (RSD_0):

Доверительный интервал экспериментальных точек относительно рассчитанной регрессионной прямой равняется произведению коэффициента Стьюдента на остаточное стандартное отклонение (RSD_{rest}) и не должен превышать максимально допустимую неопределенность методики анализа Δ_{As} (число степеней свободы точек прямой равняется $f = 9 - 2 = 7$):

$$RSD_0 / b \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, 7)} = \frac{3.2}{1.895} = 1.69\%,$$

где:

b — угол наклона для рассчитанной регрессионной прямой.

Требования к *коэффициенту корреляции* (r):

Концентрации, которые исследуются, характеризуются стандартным отклонением $RSD_Y = 39.89\%$ (Табл. 2), которое рассчитывают по формуле:

$$RSD_Y = \sqrt{\frac{\sum (C_i - C_{cp})^2}{(g-1)}} \cdot 100\%,$$

где:

C_i — концентрация i -ого раствора в % к концентрации раствора сравнения;

C_{cp} — средняя концентрация растворов;

g — число выборок (число точек прямой).

Требования к *коэффициенту корреляции* рассчитывают по формуле:

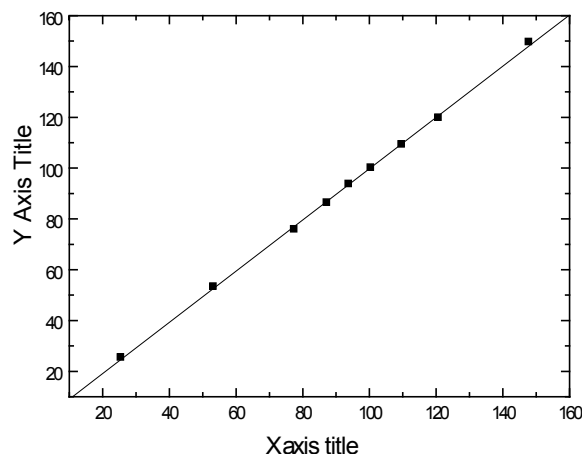
$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{RSD_0}{RSD_Y} \right)^2}$$

$$\sqrt{1 - \left(\frac{RSD_0}{RSD_Y} \right)^2} = \sqrt{1 - \left(\frac{1.69}{39.89} \right)^2} = 0.99910$$

$$r \geq 0.99910$$

Результаты изучения линейности приведены ниже (Рис. 4 и Табл. 3).

Рисунок 4



Линейная зависимость площади пика от количества сальбутамола в нормализованных координатах

Таким образом, данные Табл. 3, подтверждают, что требования к линейности для методики количественного определения сальбутамола выдерживаются.

Прогноз полной неопределенности методики. Для подтверждения корректности методики при воспроизведении ее в других лабораториях был проведен прогноз полной неопределенности методики.

Полная неопределенность методики анализа (Δ_{As}) включает в себя и неопределенность пробоподготовки (Δ_{SP}), и неопределенность конечной аналитической операции (Δ_{FAO}) [10]:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}$$

Вначале оценим неопределенность пробоподготовки:

Таблица 3

Метрологические характеристики линейной зависимости площади пика от количества сальбутамола

Параметры	Значения	Требования 1	Требования 2	Вывод
B	1.0087			
S_B	0.0091			
A	-1.08811	$\leq 1.66 $	$\leq 1.37 $	выполняются
S_A	0.878			
RSD_0	0.928			
RSD_0/B	0.920	$\leq 1.69 $		выполняются
r	0.99972	$> 0.99910 $		выполняются

- неопределенность навески СО салбутамола $0.2/20 \times 100 = 1\%$;
- неопределенность объема мерной колбы 100 мл — 0.12 %;
- неопределенность объема пипетки 5 мл — 0.6 %;
- неопределенность объема мерной колбы 100 мл — 0.12 %;
- неопределенность объема мерной колбы 100 мл — 0.12 %.

Суммарная неопределенность пробоподготовки (Δ_{SP}) равна [10]:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{1^2 + 0,12^2 + 0,6^2 + 0,12^2 + 0,12^2} = 1.18$$

Неопределенность конечной аналитической операции (хроматографирования) (Δ_{As}) рассчитывают, исходя из требований к максимальному относительному стандартному отклонению площадей пиков салбутамола на параллельных хроматограммах раствора сравнения (RSD_{max}), числа параллельных хроматограмм испытуемого раствора и раствора сравнения при анализе (n) и соответствующего ему коэффициента Стьюдента для односторонней вероятности 95 % [10]:

$$\begin{aligned} \Delta_{FAO} &= \frac{\sqrt{2} \times 1.65 \times RSD_{max}}{\sqrt{n}} = \\ &= \frac{\sqrt{2} \times 1.65 \times 2.37}{\sqrt{5}} = 2.47 \end{aligned}$$

1.65 — коэффициент Гаусса для односторонней вероятности 95 %.

В итоге, полная неопределенность методики анализа равна:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{1.18^2 + 2.47^2} = 2.74\%$$

При допустимом 10 % отклонении концентрации салбутамола сульфата в препарате рассчитанное значение суммарной неопределенности не превышает значения $max \Delta_{As} = 0.32 \times 10 = 3.2 > 2.47$. Это свидетельствует о том, что методика соответствует критериями пригодности для количественного определения действующего вещества в лекарственном препарате и будет давать корректные результаты в других лабораториях.

На основании валидированной фармакопейной методики анализа была исследована и подтверждена стабильность 5 опытных серий препарата «Салбутамол, ингаляция под давлением, 100 мкг/доза» в течение 2 лет и 3 мес. В том числе исследовалось содержание салбутамола в одной дозе, однородность дозы и доза мелкодисперсных частиц, то есть доза, осаждаемая в нижней камере устройства А, которая должна быть не менее 35 % [5]. Данные об осаждении дозы мелкодисперсных частиц в нижней камере устройства А представлены в Табл. 4.

Как видно из Табл. 4, содержание салбутамола в нижней камере устройства А для разработанного препарата составляет в среднем 42.1 %, что на 5.9 % выше этого показателя для референтного препарата «Вентолин, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза». Доза мелкодисперсных частиц коррелирует с дозой, осаждаемой в нижней части легких и проявлением эффективности терапевтического действия. Более высокая доза мелкодисперсных частиц у разработанного препарата может быть обусловлена качественной работой дозирующего клапана типа 20 DR 376/50/0-РТ и насадки-ингалятора типа V05.1227 производства фирмы «Coster Technologie Speciali S.p.a.» (Италия).

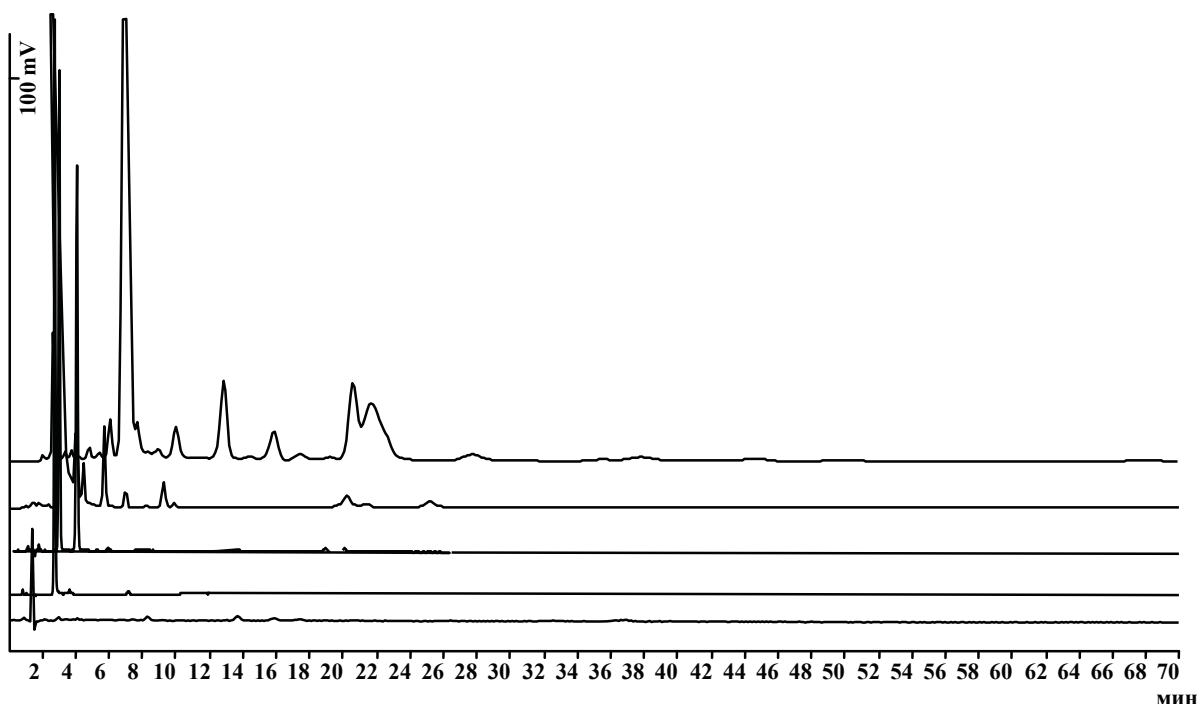
В соответствии с требованиями руководства ЕС «Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products» [13], Европейской Фармакопеи [3] и Государственной Фармакопеи Украины [14] для ингаляционных препаратов на этапе фармацевтической разработки и

Таблица 4

Результаты анализа образцов препаратов Вентолин и Салбутамол с использованием устройства А (стеклянный импинджер)

Препарат, проба	Норма по ВР [5]	Получено
Вентолин, аэрозоль, 100 мкг/доза	не менее 35 %	
1		34.2 %
2		35.3 %
3		39.0 %
<i>среднее значение</i>		36.2 %
Салбутамол, ингаляция, 100 мкг/доза	не менее 35 %	
1		39.4 %
2		44.1 %
3		42.7 %
<i>среднее значение</i>		42.1 %

Рисунок 5



сверху вниз:

- хроматограмма «стрессового» раствора препарата;
- хроматограмма испытуемого раствора;
- хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы;
- хроматограмма раствора сравнения;
- хроматограмма раствора основы препарата (плацебо).

Хроматограммы, полученные в условиях проведения испытания «Посторонние примеси»

серийного контроля необходимо определение однородности дозы. Количественное содержание сальбутамола в одной дозе проводят методом ВЭЖХ в условиях, описанных в разделе «Количественное определение». Содержание $C_{13}H_{21}NO_3$ (сальбутамола) в одной дозе препарата для 9 из 10 полученных результатов должно быть в пределах от 75 % до 125 % от среднего значения, а все полученные результаты должны быть в пределах от 65 % до 135 % от среднего значения. Если 2 или 3 значения находятся за пределами (75-125) %, испытание проводят еще для 2 баллонов. Не более 3 из 30 полученных результатов могут находиться за пределами (75-125) %, и ни один результат не должен находиться за пределами (65-135) % [3, 14].

В Табл. 5 представлены результаты определения однородности дозы для одного из баллонов.

Как видно из данных, представленных в Табл. 5, по однородности доз сальбутамола препарат соответствует требованиям, установленным Европейской Фармакопеей и Государственной Фармакопеей Украины в отношении препаратов для ингаляций [3, 14]. Содержание сальбутамола во всех дозах находятся в пределах ± 25 % от полученного среднего значения. Максимальные отклонения составляют $- 22.8$ % и $+ 17.8$ % от среднего значения количественного содержания сальбутамола в 10 дозах, что свидетельствует об однородности выдаваемой суспензии и качественной работе дозирующе-

Таблица 5

Содержание сальбутамола при определении однородности дозы

Показатель	Количественное содержание сальбутамола (мкг) в дозах №№:									
	1	2	3	101	102	103	104	198	199	200
единичная доза, мкг	80	80	96	105	107	112	98	120	116	122
средняя доза, мкг	103.6 мкг									
пределы ± 25 %	от 77.7 мкг до 129.5 мкг									
пределы ± 35 %	от 67.34 мкг до 139.86 мкг									

го клапана типа 20 DR 376/50/0-PT производства фирмы «Coster Technologie Speciali S.p.a.» (Италия).

Посторонние примеси

Согласно установленным требованиям [8, 10], при валидации методики контроля предельного содержания примесей проверяется *специфичность* и *предел обнаружения* (ПО).

Как и для субстанции, при разработке методики были использованы хроматографические колонки размером (150×4.6) мм, заполненные сорбентом Kromasil C8 (фирма «Dr. Maische») и Kromasil 100 C8 (фирмы «BIA Separation»).

Для проверки пригодности хроматографической системы использовался контроль разделительной способности системы по отношению к сальбутамолу и сальбутамолу примеси В ((1RS)-2-[(1,1-диметилэтил)амино]-1-(4-гидроксифенил) этанол). Согласно методике, включенной в фармакопейную монографию, контролируются неспецифические примеси. Нормирование предельного содержания проводят по хроматограммам испытуемого раствора, разведенного 1/100.

Содержание любой единичной примеси не должно превышать 0.5 %, а суммарное содержание примесей не должно превышать 1.0 %.

На Рис. 5 приведены типичные хроматограммы раствора препарата, полученного в «стрессовых» условиях нефилтрованным УФ-светом, испытуемого раствора препарата, раствора сравнения, раствора для проверки пригодности хроматографической системы и раствора плацебо. Из представленных хроматограмм видно, что система обладает достаточной разделительной способностью (коэффициент разделения сальбутамолу и сальбутамолу примеси В составляет около 5). Компоненты основы не влияют на результаты анализа. В исследуемых образцах содержание примесей не превышает нормы и суммарно составляет не более 0.2 %.

Из хроматограммы, представленной на Рис. 5, видно, что образующиеся при разложении сальбутамолу сульфата примеси хорошо отделяются от основного пика сальбутамолу.

Представленные данные характеризуют специфичность методики определения примесей в препарате.

При нормировании содержания примесей оценивается суммарное содержание примесей путем сравнения суммы площадей дополнительных пиков и площади пика сальбутамолу. Соответственно, ПО рассчитывается для сальбутамолу, при этом существуют три подхода:

1. $ПО \leq \max ПО = 0.32 ImL$.

2. $ПО = 3 \times S/N$, где S/N — отношение сигнал/шум.

Величина шума оценивается по амплитуде, то есть по высоте пика, и, соответственно, значение аналитического сигнала — высота пика.

Получаем в простом случае $\max ПО \geq 3 \times S/N$.

3. Следующий подход основывается на использовании порога не учитываемой площади пика, согласно которому:

$\max ПО = 3.3 \times \delta/b$, где δ — стандартное отклонение сигнала, b — тангенс угла наклона калибровочной кривой.

Методика оценена по указанным критериям и получены следующие результаты:

1. $ImL = 1 \%$ и, соответственно, $\max ПО = 0.32 \%$.

2. В условиях проведения теста величина аналитического сигнала (высота пика) составляет около 50 mV, значение амплитуды шумовых волн около 0.1 mV (или 0.05 % в нормализованных координатах). Получаем: $3 \times S/N = 50/0.1 = 500 \geq 3.2$.

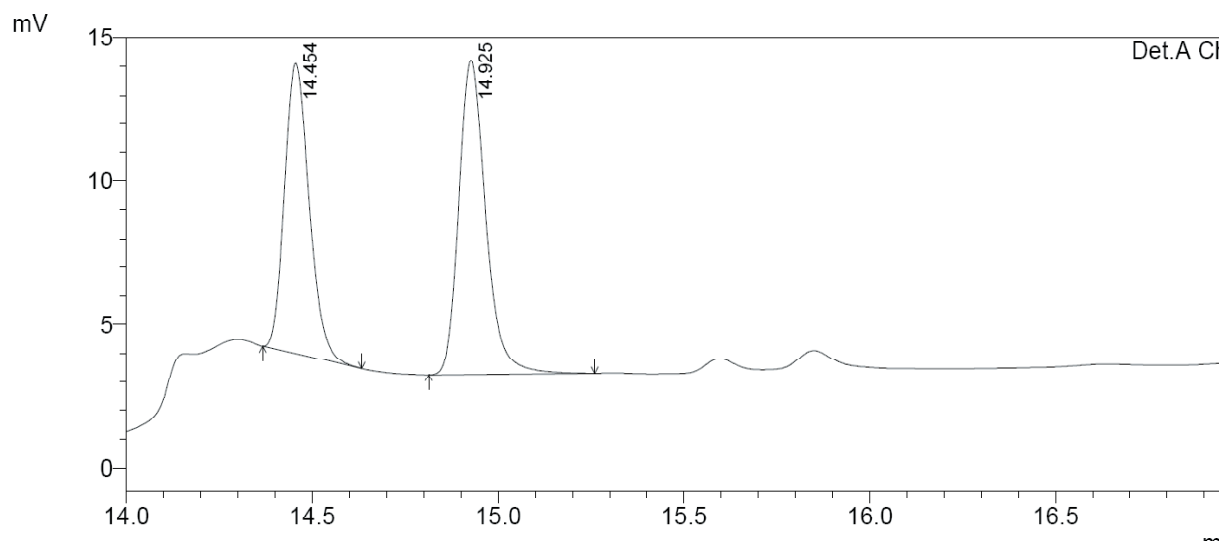
3. Используя данные, полученные при исследовании линейности методики в диапазоне содержания сальбутамолу от 0 % до 120 % от номинального значения, получаем: $3.3 \times \delta/b = 3.3 \times 0.36363/0.99845 = 1.2 \leq 3.2$.

Сальбутамолу кетон

При разработке методики определения предельного содержания сальбутамолу кетона в препарате также проверяли *специфичность* и *предел обнаружения*. Методика проведения анализа разработана на основе фармакопейной методики [5].

Определение проводят методом ВЭЖХ в режиме градиента подвижной фазы. При проведении анализа использовалась колонка размером (250 × 4.6) мм, заполненная сорбентом Kromasil C8 производства фирмы «Supelco Inc». Дополнительно введен тест для проверки пригодности хроматографической системы, где нормируется разделительная способность системы по отношению к сальбутамолу и сальбутамолу кетону; коэффициент разделения пиков сальбутамолу и сальбутамолу кетона, рассчитанный из хроматограммы раствора для проверки пригодности хроматографической системы, должен быть не менее 3 (Рис. 6). Это позволяет адекватно заменить предложенную хроматографическую колонку на колонку, заполненную сорбентом того же типа, но другого производителя (или серии). Также это позволит оценить хроматографическую систему, реализованную на другом приборе.

Рисунок 6



пик со временем удерживания около 14.5 мин соответствует сальбутамола кетону;
пик со временем удерживания около 15.0 мин соответствует сальбутамолу.

Хроматограмма раствора сравнения

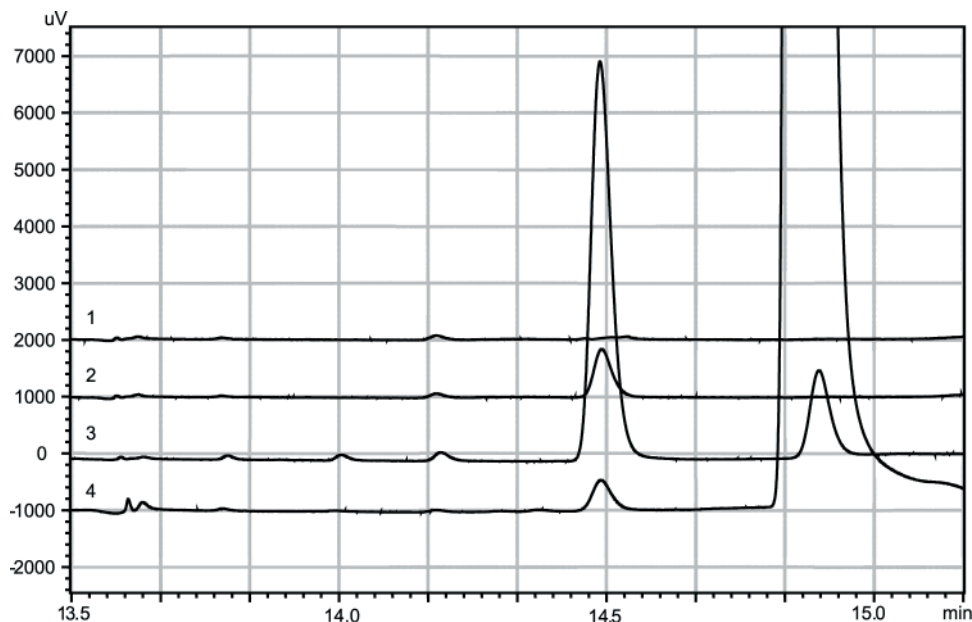
Содержание примеси оценивают по раствору сравнения, содержащему сальбутамола кетон в количестве 0.5 % от номинального содержания основного вещества сальбутамолу.

На Рис. 7 представлены типичные хроматограммы, получаемые при проведении данного теста: хроматограмма раствора плацебо; хрома-

тограмма раствора сравнения; хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы; хроматограмма испытуемого раствора.

Как видно из представленных хроматограмм, пики сальбутамолу и сальбутамола кетона хорошо разделяются (коэффициент разделения более 3),

Рисунок 7



сверху вниз:

хроматограмма раствора плацебо;
хроматограмма раствора сравнения;
хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы;
хроматограмма испытуемого раствора.

Хроматограммы, полученные в условиях проведения испытания «Сальбутамола кетон»

компоненты основы не влияют на результаты анализа, имеет место точное совпадение времен удерживания пиков сальбутамола кетона на хроматограммах раствора сравнения, испытуемого раствора и раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Это подтверждает специфичность методики.

В испытуемом образце препарата содержание сальбутамола кетона не превышает нормы (не более 0.5 %) и составляет 0.03 %.

При разработке критериев приемлемости для методики определения предельного содержания сальбутамола кетона в препарате ориентировались на те же подходы, что и для неспецифических посторонних примесей. Получены следующие результаты:

1. $ImL = 0.5$ % и, соответственно, $max PO = 0.16$ %.

2. В условиях проведения теста величина аналитического сигнала (высота пика) составляет около 45 mV, значение амплитуды шумовых волн около 0.1 mV (или 0.05 % в нормализованных координатах). Получаем: $3 \times S/N = 45/0.1 = 450 \geq 3.2$.

3. Используя данные, полученные при исследовании линейности методики в диапазоне содержания сальбутамола кетона от 25 % до 120 % от предельно допустимого в препарате, получаем: $3 \times \delta/b = 3.3 \times 0.85378/1.08046 = 3.04 \leq 3.2$.

Выводы

1. Апробирована фармакопейная методика определения примесей методом ВЭЖХ в субстанции сальбутамола сульфата и показаны ее особенности при использовании разных хроматографических колонок.

2. Для анализа препарата «Сальбутамол, ингаляция под давлением, 100 мкг/доза» использована фармакопейная методика количественного определения сальбутамола сульфата методом ВЭЖХ и проведена ее валидация по характеристикам специфичность, правильность, прецизионность и линейность. На основании расчета полной неопределенности показано, что методика разработана в соответствии с критериями пригодности для количественного определения сальбутамола сульфата в лекарственном препарате и будет давать корректные результаты в других лабораториях.

3. Валидированная методика количественного определения сальбутамола применена при испытаниях «Доза мелкодисперсных частиц», «Однородность дозы» и «Количественное определение» для препарата «Сальбутамол, ингаляция под давлением, 100 мкг/доза».

Показано соответствие разработанного препарата фармакопейным требованиям по этим показателям.

4. Для определения неспецифических примесей и примеси сальбутамола кетона методом ВЭЖХ в препарате «Сальбутамол, ингаляция под давлением, 100 мкг/доза» использованы две соответствующие фармакопейные методики и проведена их валидация по характеристикам специфичность и предел обнаружения.

ЛИТЕРАТУРА

- Essential Drug List. – 2007. – www.WHO. Ind.
- Salbutamol Sulphate // European Pharmacopoeia. - 6.0 ed. - Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007. – P. 2857-2859.
- Preparations for Inhalation // European Pharmacopoeia. – 5.0 ed. – Suppl. 5.6. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2005. – 2843-2847 p.
- 2.9.18. Preparations for Inhalation: Aerodynamic Assessment of Fine Particles // European Pharmacopoeia. – 5th ed. – Suppl. 5.6. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2006. – 3103-3115 p.
- Salbutamol Pressurised Inhalation // British Pharmacopoeia. – Vol. II. – London: HMSO, 2007. – CD-edition, Version 11.0.
- USP Pharmacopoeia 30. General Chapter <1010> Analytical Data — Interpretation and Treatment.
- General Information Chapter 1226 «Verification of Compendial Procedures» // Pharm. Forum. – 2005. - № 31 (2). – P. 555-558.
- Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна и др. – М., 2007. – 48 с.
- Компендиум 2006 – лекарственные препараты: В 2-х т. / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – Т. 1. – К.: «МОРИОН», 2006. – С. Л-253 – Л-254.
- 2.2.N.2. Валидація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – С. 85-100.
- Oleyl Alcohol // European Pharmacopoeia. - 6.0 ed. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007. - P. 2544-2545.
- Етанол (96 %) // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 1. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2004. – С. 339-343.
- Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products. – London, 16 February 2005. – 25 p.
- Лікарські засоби для інгаляції // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – С. 298-303.

Резюме

Бовтенко В.О., Безугла О.П., Ляпунов М.О., Столпер Ю.М.

Валидація методик аналізу препарату «Сальбутамол, інгаляція під тиском, 100 мкг/доза»

Розглянуто фармакопейну методику визначення домішок методом ВЕРХ у субстанції сальбутамола сульфату та показано її особливості при використанні різних хроматографічних колонок. Для аналізу препарату «Сальбутамол, інгаляція під тиском, 100 мкг/доза» використано фарма-

копейну методику кількісного визначення салбутамолу сульфату методом ВЕРХ і проведено її валідацію за характеристиками специфічності, правильності, прецизійності, лінійності, діапазон застосування. На підставі розрахунку повної невизначеності показано, що методика відповідає критеріям придатності для кількісного визначення салбутамолу сульфату у препараті і даватиме коректні результати в інших лабораторіях. Валідована методика кількісного визначення салбутамолу застосована при випробуваннях «Доза дрібнодисперсних часток», «Однорідність дози» і «Кількісне визначення». Показано відповідність розробленого препарату фармакопейним вимогам за цими показниками. Для визначення неспецифічних домішок і домішки салбутамолу кетону методом ВЕРХ у препараті використано дві відповідні фармакопейні методики і проведено їх валідацію за характеристиками специфічності і межа виявлення.

Summary

Bovtenko V.A., Bezuglaya E.P.,
Lyapunov N.A., Stolper Yu.M.

Validation of methods of an analysis of the preparation Salbutamol inhalation under pressure 100 mkg/dose

Pharmacopoeic methods of the determination of impurities by HPLC in salbutamol sulphate substance were examined and its characteristics at the use with different chromatographic columns was shown. For the analysis of the preparation Salbutamol inhalation under pressure 100 mkg/dose pharmacopoeic method of the assay of salbutamol sulphate by HPLC was used and its validation by such indices: specificity, accuracy, precision, linearity, range of the use was conducted. Under calculations of complete uncertainty was shown that the method conform to criterion of availability for the assay of salbutamol sulphate in the preparation and will give correct data in oth-

er laboratories. Validated method of the assay of salbutamol at the test «Dose of fine particles», «Uniformity of dose» and «Assay» was used. A conformity of developed preparation to pharmacopoeic requirements according those indices was shown. For the determination of nonspecified impurities and an impurity of salbutamol ketone by HPLC in preparation two corresponding pharmacopoeic methods were used and their validation under the indices specificity and threshold of detectability was conducted.

Бовтенко Владимир Александрович (р. 1970). Окончил Харьковский государственный университет (1994). Науч. сотр. лаборатории жидких и мягких лекарственных средств и аэрозолей ГП ГНЦЛС (с 1994).

Безуглая Елена Петровна. Ст. науч. сотр. лаборатории жидких и мягких лекарственных средств и аэрозолей ГП ГНЦЛС (с 1996). К.фарм.н. (1996).

Ляпунов Николай Александрович (р. 1950). Окончил Харьковский фармацевтический институт. Работает в ГП ГНЦЛС (с 1972). Заведующий лабораторией жидких и мягких лекарственных средств и аэрозолей ГП ГНЦЛС. Д.фарм.н. (1990.). Профессор (1993). Член редакционного Совета Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ).

Столпер Юрий Михайлович (р. 1971). Окончил Харьковский политехнический институт (1996). Ст. науч. сотр. лаборатории жидких и мягких лекарственных средств и аэрозолей ГП ГНЦЛС (с 1997). К.фарм.н. (2008).

УДК 615.23:615.07

Степаненко С.В., Чуєшов В.І., Ханін В.А.
Національний фармацевтичний університет

Розробка методик кількісного визначення діючих речовин у складі комплексного препарату пульмонологічного призначення

Розроблено оригінальну ВЕРХ методику кількісного визначення амброксолу гідрохлориду, кетотифену гідрофумарату та теоброміну на октадецилсилільних сорбентах за умови їх спільної присутності у препараті. Проведено стандартизацію умов хроматографічного розділення амброксолу гідрохлориду, кетотифену гідрофумарату та теоброміну у зразках препарату. Встановлено вимоги щодо придатності хроматографічної системи. Підтверджено придатність фармакопейної методики кількісного визначення гліциризинової кислоти для контролю вмісту екстракту кореня солодки у препараті.

Запальні захворювання дихальних шляхів (гостра респіраторна вірусна інфекція, бронхіти, пневмонії тощо) широко розповсюджені серед населення та є однією з найбільш важливих медичних проблем, особливо у педіатрії, оскільки, за даними офіційної статистики, вони посідають одне із перших місць (50-73) % у структурі захворюваності дітей [1-3]. Високий рівень захворюваності на гострі респіраторні інфекції є важливою соціальною проблемою. Діти, які часто хворіють на респіраторні інфекції, складають групу ризику за розвитком гострих бронхітів, бронхіолітів, формуванням рецидивуючих бронхітів і хронічної бронхоле-

генової патології у майбутньому. Ці захворювання найчастіше є причиною тривалої непрацездатності, а також інвалідності серед дорослого населення [1, 4, 5].

Як правило, лікування захворювань дихальних шляхів потребує тривалого прийому 2-4 препаратів по декілька разів на добу, що суттєво ускладнює ефективність терапії, особливо у дітей і пацієнтів похилого віку. На фармацевтичному ринку України вже спостерігається тенденція до застосування комбінованих препаратів для лікування захворювань дихальної системи [6, 7]. Поєднання декількох діючих речовин із різними фармакологічними властивос-

тями дозволяє водночас позитивно вплинути на всі ланки патологічного процесу, знизити терапевтичні дози діючих речовин, уникнути поліпрагмазії, що дає змогу суттєво скоротити час, необхідний для проведення лікування, та підвищити якість життя хворого. Проте, можна відзначити практичну відсутність вітчизняних комплексних препаратів для лікування хронічних обструктивних захворювань легень.

Враховуючи вищенаведене, нами обрано створення саме комбінованого лікарського засобу для лікування хронічних обструктивних захворювань легень, до складу якого пропонується введення амброксолу гідрохлориду, кетотифену гідрофумарату, теоброміну й екстракту кореня солодки [6–8]. У ході попередніх досліджень запропоновано такий вміст діючих речовин у таблетці: кетотифену гідрофумарату — 1 мг, амброксолу гідрохлориду — 15 мг, екстракту кореня солодки сухого — 10 мг, теоброміну — 50 мг. В якості допоміжних до складу таблеток планується включити такі речовини: целюлозу мікрокристалічну, натрію кроскармелозу, крохмаль картопляний і кальцію стеарат.

Контроль якості багатокомпонентних лікарських препаратів на сьогодні можливий лише із використанням аналітичних методів, що мають високу селективність і чутливість по відношенню до речовин, що визначаються. Найширше застосування в аналізі лікарських засобів одержала високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) [9–11]. Цей метод дозволяє розділити близькі за фізико-хімічними властивостями сполуки та проводити їх визначення у дуже низьких концентраціях [12].

Тому, враховуючи багатокомпонентний склад та незначні кількості діючих речовин, для аналізу препарату нами було обрано метод ВЕРХ.

Активні компоненти препарату можна віднести до класу полярних сполук, що мають молекулярну масу більше 300 а.о. та містять у своїй структурі хромофорні групи, добре поглинають в УФ-області. Враховуючи це, було прийняте рішення використовувати обернено-фазовий варіант ВЕРХ для проведення аналізу. Допоміжні речовини не заважають визначенню діючих речовин і не впливають на результати, отримані за цією методикою.

Дослідження проводилися на хроматографі НР 1100 із діодною матрицею в якості детектора, що дозволило контролювати ступінь розділення речовин і чистоту піків аналізованих сполук. Наявність у системі 4-х каналного насосу забезпечувала широкі можливості при створенні градієнта низького тиску та збільшувала розділювальну здатність системи.

Для виконання вимірювань використовували колонку Atlantis dC18 (Waters corp.) розміром (250×4.6) мм, заповнену сорбентом октадецилсилильним із прищепленою фазою октадецилсиликагель, із розміром частинок 5 мкм. Згідно даних виробника сорбент цієї колонки відповідає типу L1 за класифікацією ДФУ [13].

Визначення вмісту гліциризинової кислоти (екстракт кореня солодки) у препараті не потребувало розробки нових підходів, оскільки ДФУ вже містить ВЕРХ методикою для її визначення [14]. У зв'язку з цим нами було проведено верифікацію фармакопейної методики, в ході якої доводилася специфічність методики по відношенню до речовини, що визначалася, — гліциризинової кислоти. Дослідження показало можливість визначення гліциризинової кислоти у препараті за методикою [14]. Доведено, що інші компоненти препарату не впливають на визначення кислоти гліциризинової.

Однак, для спільного кількісного визначення амброксолу гідрохлориду, кетотифену гідрофумарату та теоброміну необхідно було розробити методикою ВЕРХ, що дозволяла б не лише ефективно розділити самі ці речовини, але й допоміжні компоненти, продукти деградації активних інгредієнтів.

Цю задачу було вирішено шляхом створення градієнтної ВЕРХ методикою, що дозволила не лише розділити аналізовані речовини, але й забезпечити метрологічні характеристики кількісного визначення, що повністю відповідають вимогам ДФУ. Оскільки рідинний хроматограф, що використовувався для дослідження, був оснащений автоматичним пристроєм введення проб, кількісне визначення амброксолу гідрохлориду, кетотифену гідрофумарату та теоброміну проводили методом абсолютного калібрування, що потребувало розробки методик приготування досліджуваного розчину та розчину порівняння. Умови хроматографування наведено нижче.

Методика кількісного визначення амброксолу гідрохлориду, кетотифену гідрофумарату та теоброміну

Приготування зразка препарату. Близько 0.5 г (точна наважка) порошку 10 розтертих таблеток (середня маса таблетки 140 мг) поміщали у мірну колбу місткістю 10 мл, додавали 5 мл метанолу, струшували протягом 20 хв, доводили об'єм розчину метанолом до позначки, перемішували та фільтрували через скляний фільтр ПОР16.

Приготування розчину сумарного СЗ. 0.25 г (точна наважка) (СЗ) теоброміну, 0.05 г (точна наважка) СЗ кетотифену гідрофумарату, 0,05 г

(точна наважка), СЗ амброксолу гідрохлориду поміщали у мірну колбу місткістю 100 мл, додавали 50 мл метанолу, збовтували до повного розчинення, доводили об'єм розчину метанолом до позначки та перемішували. Розчин використовували свіжоприготованим.

Умови хроматографування:

Колонка Atlantis dC18 (Waters corp.) розміром (250×4.6) мм, заповнена сорбентом із прищепленою фазою октадецилсилікагель із розміром частинок 5 мкм.

Таблиця 1

Схема елюювання

Час, хв	Вміст РФ А, %	Вміст РФ Б, %	Режим елюювання
0	80	20	ізократичний
5	80	20	лінійний градієнт
6	50	50	
15	50	50	лінійний градієнт
16	90	10	
25	80	20	ізократичний

Режим елюювання — градієнтний.

Рухома фаза А: буферний розчин рН 3,0, дегазований будь-яким підходящим способом.

Рухома фаза Б: ацетонітрил, дегазований будь-яким підходящим способом.

Детектування за довжини хвилі — 254 нм.

Швидкість потоку — 1 мл/хв.

Об'єм інжекції — 20 мкл.

Температура термостату колонки — 30 °С.

Перед початком хроматографування колонку кондиціонували протягом 30 хв рухомою фазою складу РФ А / РФ Б (80:20).

Для забезпечення статистичної достовірності отриманих результатів вимірювань, згідно вимог ДФУ, хроматографували розчин порівняння, отримуючи не менше 5 хроматограм [15]. Для площі піків теоброміну, кетотифену або амброксолу із отриманих хроматограм розраховували відносне стандартне відхилення (*RSD*).

Отримання паралельних хроматограм припиняли при досягненні вимог до *RSD*, що зазначені нижче:

№	2	3	4	5	6
<i>RSD</i> (%) <					
для допуску вмісту ± 10 %	0.51	1.34	1.92	2.37	2.75

Попеременно хроматографували розчин препарату, розчин порівняння, отримуючи число паралельних хроматограм (*n*) для кожного із розчинів не менше ніж при перевірці придатності хроматографічної системи за наведеними хроматографічними умовами.

Враховуючи прямо пропорційну залежність аналітичного сигналу від концентрації дослі-

джуваних розчинів, вміст теоброміну, кетотифену гідрофумарату або амброксолу гідрохлориду, в одній таблетці, у грамах, обчислювали за формулою:

$$\frac{S_i \times m_o \times 10 \times P \times b}{S_o \times m_i \times 100 \times 100}$$

де:

S_i — середнє значення площі піка теоброміну, кетотифену або амброксолу, обчислене із хроматограм розчину препарату;

S_o — середнє значення площі піка теоброміну, кетотифену або амброксолу, обчислене із хроматограм розчину сумарного СЗ;

m_o — маса наважки теоброміну, кетотифену або амброксолу у сумарному СЗ, у грамах;

P — вміст основної речовини у СЗ теоброміну, СЗ кетотифену гідрофумарату або СЗ амброксолу гідрохлориду;

b — середня маса таблетки, у грамах (0.140±10%).

Ідентифікація хроматографічних піків проводилася стандартним методом добавок і за характерними для кожної речовини спектральними співвідношеннями.

На Рис. 1-3 надано хроматограми стандартних зразків речовин (амброксолу гідрохлориду, кетотифену гідрофумарату та теоброміну, відповідно). На Рис. 4 наведено хроматограму розчину препарату. Усі хроматограми одержано за зазначених вище умов. На Рис. 5 наведено пік гліциризинової кислоти на хроматограмі розчину препарату. На Рис. 6 наведено хроматограму стандартного зразка гліциризинової кислоти.

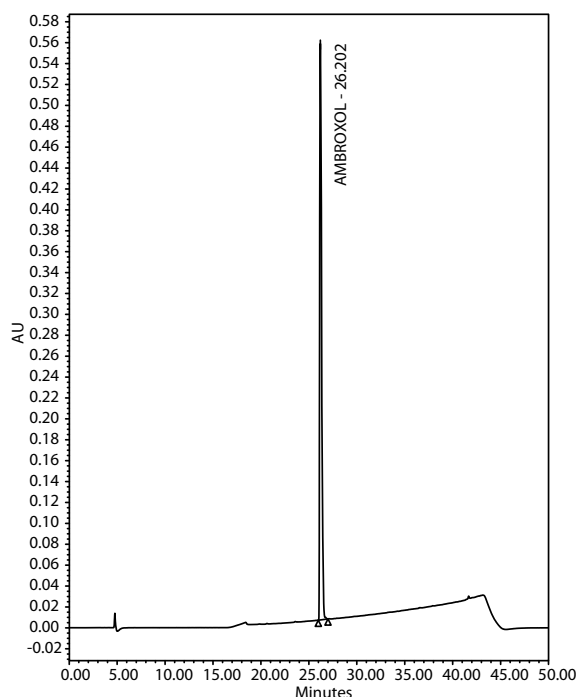
Відповідність часів утримування хроматографічних піків окремих речовин та аналізованого препарату, а також належне розділення піків підтверджують можливість розділення, ідентифікації та кількісного визначення амброксолу гідрохлориду, кетотифену гідрофумарату та теоброміну при їх спільній присутності у препараті.

Методику було апробовано на вплив різних факторів, таких як: колонки різних виробників (Symmetry C18 (250×4.6) мкм, Eclipse XDB18 (250×4.6) мкм), швидкість потоку, склад рухомої фази та температура термостату колонки. Встановлено, що вплив цих факторів є незначущим та не впливає на результати, що отримані за цією методикою.

Метрологічні характеристики хроматографічної методики кількісного визначення наведено в Табл. 2.

ДФУ вимагає проводити визначення кількісного вмісту кислоти гліциризинової із ви-

Рисунок 1

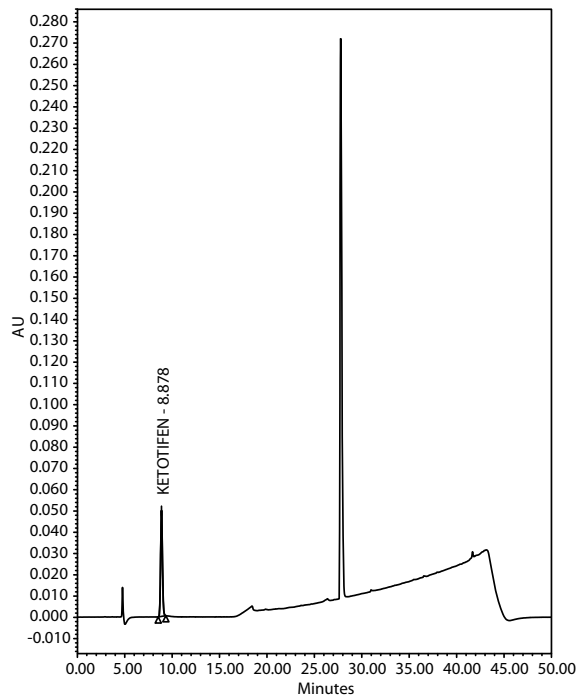


Хроматограма стандартного зразка амброксолу гідрохлориду

користанням стандартного зразка моноамонію гліциризату з нормуванням вмісту не менше 4 % у препараті. Метрологічні характеристики наведено в Табл. 3

Для стандартизації умов кількісного визначення до методики введено розділ «Придатність

Рисунок 2



Хроматограма стандартного зразка кетотифену гідрофумарату

хроматографічної системи», що містить наведені нижче вимоги до аналітичної системи.

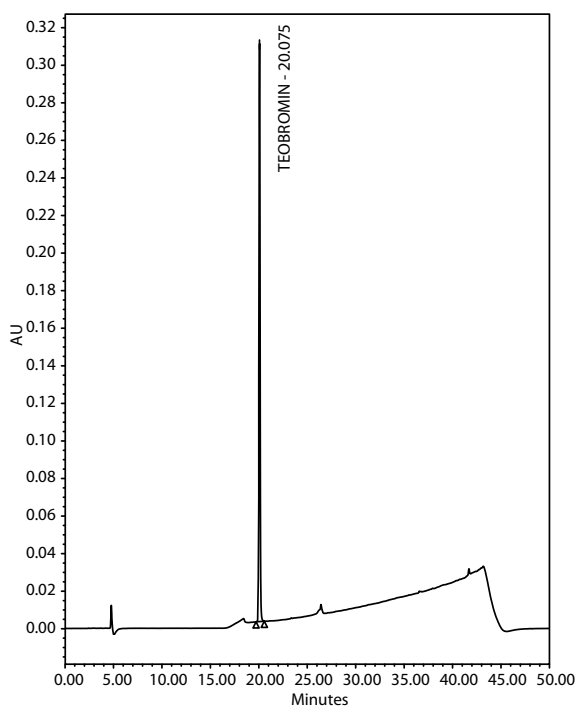
Ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком теоброміну, кетотифену або амброксолу на хроматограмі сумарного СЗ, має бути не менше 2000 теоретичних тарілок

Таблиця 2

Метрологічні характеристики методики кількісного визначення амброксолу гідрохлориду, кетотифену гідрофумарату та теоброміну

μ	X_i	f	X	S_2	S_x	$P, \%$	$t(p, f)$	ΔX_{cp}	$\varepsilon_{cp}, \%$
<i>амброксолу гідрохлорид</i>									
15	15.1 15.0 15.7 14.9 15.8 14.8	5	15.2	3.89	0.503	95	2.56	0.42	+ 1.8
<i>кетотифену гідрофумарат</i>									
1	0.93 0.96 0.99 1.02 0.98	5	0.977	$98.5 \cdot 10^{-2}$	$6.08 \cdot 10^{-2}$	95	2.57	$20.2 \cdot 10^{-2}$	+ 2.0
<i>теобромін</i>									
50	49.7 50.0 50.7 49.0 50.8 48.5	5	49.8	$83.8 \cdot 10^{-2}$	$91.5 \cdot 10^{-2}$	95	2.57	$86 \cdot 10^{-2}$	± 2.1

Рисунок 3



Хроматограма стандартного зразка теоброміну

[13]; коефіцієнт симетрії піка, розрахований за піком теоброміну, кетотифену або амброксолу із хроматограм розчину сумарного СЗ, має бути не більше 1.8 [13].

Нормування вмісту речовин, що визначалися, по відношенню до їх номінального вмісту у препараті, запропоновано проводити у діапазоні $\pm 10\%$. Підставою для цього стали вимоги ДФУ до нормування вмісту активних речовин у ГЛЗ та значення повної невизначеності отриманих результатів — 2.63% [13]. Враховуючи той факт, що найближче значення максимальної повної невизначеності результатів для ГЛЗ становить 3.2%, згідно вимоги принципу незначущості отримуємо допуск для досліджуваних речовин 10%.

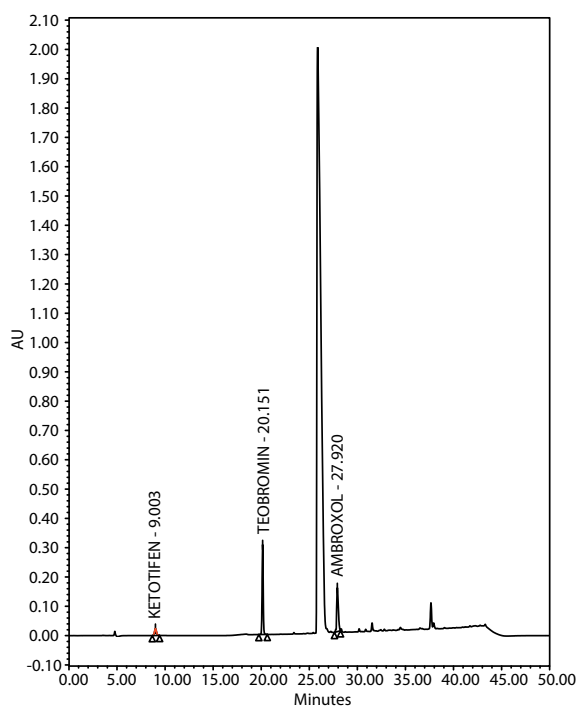
Таким чином, вміст теоброміну у таблетці має становити від 0.0045 г до 0.0055 г, кетотифену гідрофумарату — від 0.0099 г до 0.011 г, амброксолу гідрохлориду — від 0.0135 г до 0.0165 г., у перерахунку на середню масу однієї таблетки.

Таблиця 3

Метрологічні характеристики методу кількісного визначення кислоти гліциризинової

μ	X_i	f	X	S^2	S_x	$P, \%$	$t(p, f)$	ΔX_{cp}	$\varepsilon_{cp}, \%$
0.5	0.51 0.53 0.54 0.53 0.52	5	0.526	$72.5 \cdot 10^{-2}$	$2.0 \cdot 10^{-4}$	95	2.56	$2.56 \cdot 10^{-2}$	± 1.9

Рисунок 4



Хроматограма розчину препарату

На етапі розробки методики як стандартні зразки було використано хімічно чисті речовини (99.8%), на етапі валідації та стандартизації методики планується використання ФСЗ ДФУ.

Висновки

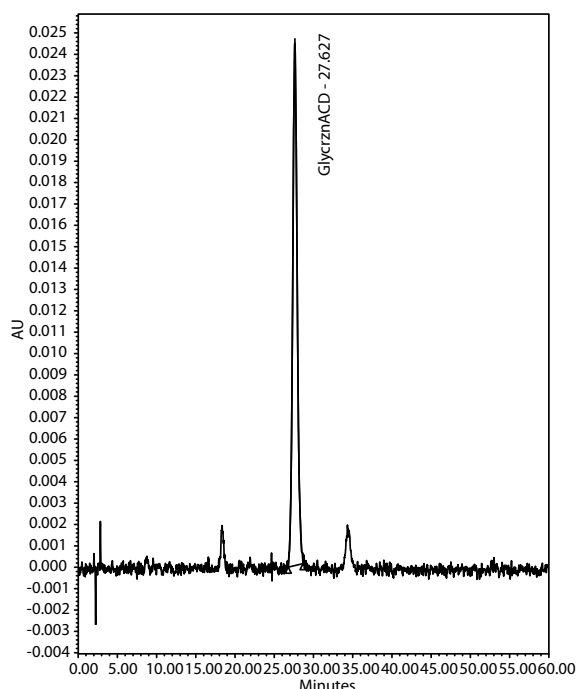
Визначено підходи до побудови аналітичної методики контролю усіх активних компонентів, що входять до складу комплексного препарату пульмонологічного призначення.

Проведено стандартизацію умов хроматографічного розділення амброксолу гідрофумарату, кетотифену гідрофумарату та теоброміну у зразках препарату. Встановлено вимоги до придатності хроматографічної системи.

На основі методу ВЕРХ розроблено оригінальну методику кількісного визначення амброксолу гідрофумарату, кетотифену гідрофумарату та теоброміну на октадецилсилільних сорбентах.

Підтверджено придатність фармакопейної методики кількісного визначення гліциризи-

Рисунок 5



Пік гліциризинової кислоти на хроматограмі розчину препарату

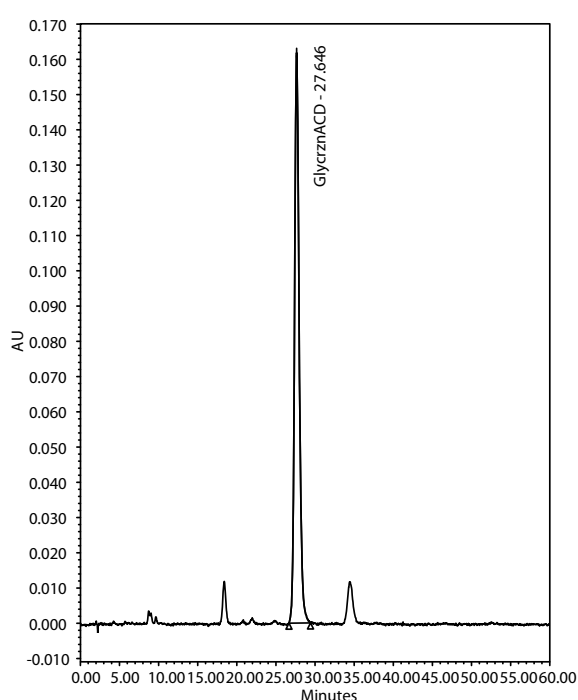
нової кислоти для контролю вмісту екстракту кореня солодки у препараті.

За даними статистичної обробки результатів випробування модельних сумішей і зразків препарату встановлено допуски нормування активних інгредієнтів у таблетках.

ЛІТЕРАТУРА

1. Медицинская статистика Украины: статистико-аналитический справочник. — Киев, 2000. — 120 с.
2. Середа Е. В. Бронхиты у детей: современные принципы терапевтической тактики // Фарматека. — 2002. — № 11. — С. 38 — 44.
3. Таточенко В. К. Бронхиты / Под ред. В.К. Таточенко. — М.: Медицина, 2000. — С. 101 — 111.
4. Gonzales R., Sande M.A. Uncomplicated Acute Bronchitis // Ann. Intern. Med. — 2000. — Vol. 133. — P. 981 — 990.
5. Longo B.M., Yang W. Acute Bronchitis and Volcanic Air Pollution: A Community-Based Cohort Study at Kilauea Volcano, Hawaii, USA // J. Toxicol. Environ. Health A. — 2008. — Vol. 71, № 24. — P. 1565 — 1571.
6. Листопад А. Отхаркивающие и муколитические препараты в структуре фармацевтического рынка Украины // Провизор. — 2000. — № 2. — С. 26 — 29.
7. Yanney M., Vyas H. The treatment of bronchiolitis // Arch. Dis. Child. — 2008. — Vol. 93, № 9. — P. 793 — 798.
8. Белоусов Ю.Б. Клиническая фармакология болезней органов дыхания / Ю. Б. Белоусов, В. В. Омеляновский. — М.: Универсум паблишинг, 1996. — 176 с.
9. Препаративная жидкостная хроматография / Под ред. Б. Биддингмейера. — М.: Мир, 1990. - 358 с.
10. Яшин Я.И., Яшин А.Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы / Рос. хим. ж. — 2003. - Т. XLVII, № 1. — С. 64-79.
11. Барам Г.И., Гольдберг Е.Д., Рейхарт Д.В., Хабриев Р., В.А. Хазанов В.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в контроле качества лекарственных средств // <http://www.asvomed.ru/php/content.php?id=2412>

Рисунок 6



Хроматограма стандартного зразка гліциризинової кислоти

12. Применение ВЭЖХ для контроля некоторых лекарственных средств / Гризодуб А.И, Георгиевский В.П., Левин М.Г. и др. : Материалы II съезда фармацевтов Грузии. — Тбилиси, 1987. — С. 193 — 195.

13. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.

14. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001.- Доповнення 1. — 2004. - 520 с.

15. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» - 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. - 620 с.

Резюме

Степаненко С.В., Чушов В.И., Ханин В.А.

Разработка методик количественного определения действующих веществ в составе комплексного препарата пульмонологического назначения

Разработана оригинальная ВЭЖХ методика количественного определения амброксола гидрохлорида, кетотифена гидрофумарата и теобромину на октадецилсилильных сорбентах при их совместном присутствии в препарате. Проведена стандартизация условий хроматографического разделения амброксола гидрохлорида, кетотифена гидрофумарата и теобромину в образцах препарата. Установлены требования к пригодности хроматографической системы. Подтверждена пригодность фармакопейной методики количественного определения глицырризиновой кислоты для контроля содержания экстракта корня солодки в препарате.

Summary

Stepanenko S.V., Chueshov V.I., Khanin V.A.

Development of methods of an assay of active substances in a composition of complex pulmonological preparation

Original HPLC method of an assay of ambroxol hydrochloride, ketotifen hydrogen fumarate and theobromine on

octadecylsilyl sorbents subject to their combined presence in preparation was developed. A standardization of conditions of chromatographic separation of ambroxol hydrochloride, ketotifene hydrogen fumarate and theobromine in samples of preparation was conducted. A suitability of pharmacopoeia method of the assay of glycyrrhizic acid at the control of the content of an extract of liquorice root in preparation was confirmed.

Степаненко Сергій Володимирович. Аспірант кафедри промислової фармації Національного фармацевтичного університету (НФаУ).

Чуєшов Владислав Іванович. Д.фарм.н. Професор. Зав. кафедри промислової фармації НФаУ.

Ханін Вадим Андрійович. К.т.н. (1993.). Доцент кафедри промислової фармації та економіки Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації.

Технологія лікарських засобів

УДК 615.453:615.014.21:66.047

Ковалевська І.В., Рубан О.А., Чернов А.М.
Національний фармацевтичний університет

Визначення параметрів режиму сушіння гранул із рослинними екстрактами в комбінації із синтетичними речовинами

Наведено результати зі встановлення параметрів процесу сушіння грануляту для інкапсулювання із використанням математичного моделювання. Розрахунки проводилися за допомогою математичного пакета MathCad. Індиферентність речовин у складі препарату після технологічної переробки було доведено рентгеноструктурним аналізом.

Створення оригінальних препаратів вітчизняного виробництва для профілактики та лікування найбільш поширених захворювань серцево-судинної системи є актуальним завданням вітчизняної медицини. Тому на кафедрі промислової фармації НФаУ сумісно із ВАТ ХФЗ «Червона зірка» було розроблено технологію виробництва капсул кардіотропної дії на основі поєднання рослинних і синтетичних речовин.

Попередніми дослідженнями було встановлено, що введення допоміжних речовин у суміш діючих не забезпечило необхідних технологічних показників маси для інкапсулювання та доведено необхідність застосування методу вологого гранулювання [1]. Було проведено вибір виду сушіння з одночасною деконтамінацією грануляту та визначення його мікробіологічної чистоти. На підставі отриманих даних нами був вибраний вид контактного сушіння при одержанні гранул.

Метою даної роботи є визначення критичних параметрів сушіння гранул із рослинними екстрактами в комбінації із синтетичними речовинами на основі дослідження кінетики процесу при різних температурах.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були порошки тіотриазоліну, дипіридамолу, екстрактів глоду, меліси, їх суміш, допоміжні речовини, що входять

до складу препарату, та гранулят, одержаний при різних температурах сушіння.

Кожна речовина, що входить до складу гранул, має характерну термічну поведінку, яка залежить від її хімічної будови. Тому дослідження температурних режимів їх розкладання дозволяє встановити оптимальні режими термічної обробки гранул [3, 4].

Термогравіметричні дослідження проводили на дериватографі Q-1000 фірми МОМ (Угорщина). Зйомка проводилась у динамічному режимі в атмосфері повітря. Швидкість нагрівання — 10 °С/хв в інтервалі температур 20 °С - 500 °С; середня маса наважки порошку або гранул близько 40 мг; чутливість записуючого пристрою для кривої ТГ — 0.384 мг/мм, ДТГ — 2 мкВ/мм, ДТА — 1 мкВ/мм; швидкість зміни температури — 2 град/хв, швидкість руху паперу — 2.5 мм/хв.

Сушіння грануляту проводилося у сушильній шафі при температурах 40 °С, 50 °С, 60 °С.

Рентгеноструктурний аналіз проводили на дифрактометрі Дрон-3 в умовах Cu-K α -випромінювання ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$). Швидкість кутового переміщення зразка — 1-2 град/хв. Напруга на трубі — 18кV, сила струму — 10mA.

Дифракційною характеристикою речовини є спектр значень міжплощинних відстаней (d , \AA) та відносних інтенсивностей ($I_{\text{відн}}$), що відбиті від цих площин. Іntenсивність дифракційного максимуму визначали за висотою піка. За 100 %

приймали найбільш інтенсивний пік серед усіх виявлених піків.

Результати досліджень та їх обговорення

Для визначення температурного режиму сушіння вологих гранул було використано термогравіметричний аналіз, який дозволяє у динамічних умовах прослідкувати за тепловими ефектами, що виникають у речовинах та їх сумішах.

Аналіз дериватограм діючих, допоміжних

речовин та їх сумішей показав, що у складі лікарської форми наявні неоднорідні за фізико-хімічними властивостями речовини. Сухі екстракти, крохмаль картопляний, МКЦ є термолабільними, гігроскопічними речовинами, в яких процес перетворювання починається при температурі 50 °С (крохмаль, екстракт меліси) — 80 °С (екстракт глоду, МКЦ). Дипіридамо́л і тіотриазолін є термостабільними речовинами. У суміші діючих і допоміжних речовин початкова температура розкладання незначно вище по-

Таблиця 1

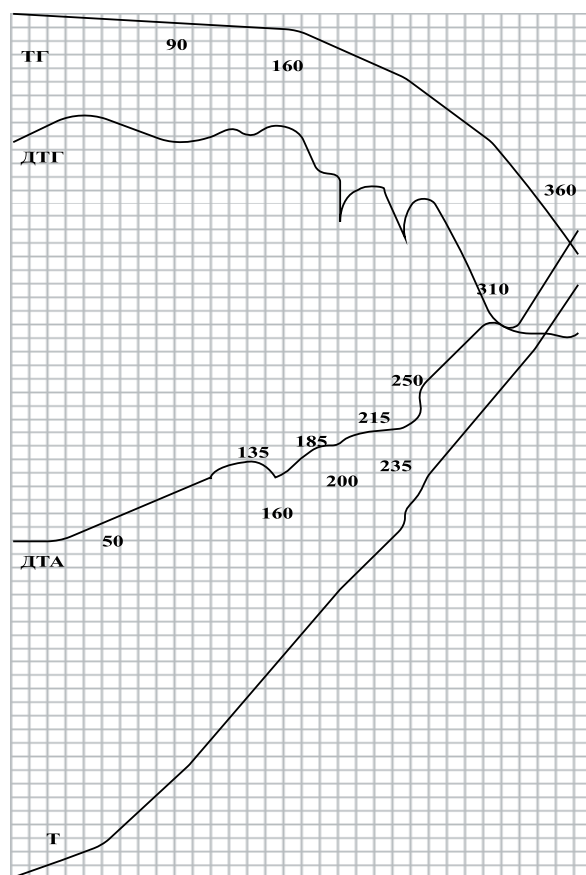
Основні характеристики дифракційних кривих речовин

Речовина	Кут відображення (2θ), °	Міжплощинні відстані (d), Å	Відносна інтенсивність I _i /I ₁₀₀
тіотриазолін	15.00	5.89	35
	16.00	5.53	85
	17.40	5.09	74
	21.30	4.12	100
	25.60	3.47	96
	26.20	3.39	97
	34.50	2.74	19
	40.50	2.22	42
дипіридамо́л	42.20	1.89	15
	8.2	10.77	97
	9.00	9.80	94
	10.50	8.41	100
	16.40	5.39	18
	17.60	5.03	64
	19.00	4.70	66
	20.8	4.26	55
	23.60	3.76	50
	26.00	3.25	52
сухий екстракт глоду	28.50	2.70	31
	30.50	2.44	38
сухий екстракт меліси	20.50	4.33	100
	22.00	4.03	8
	28.50	3.13	100
	40.50	2.22	50
крохмаль картопляний	50.31	1.81	28
	12.00	7.37	6
	14.50	6.18	48
	17.30	5.13	100
	20.00	4.44	9
	22.20	4.00	27
	24.00	3.71	4
	31.00	2.88	12
	35.00	2.56	5
МКЦ	38.40	2.34	8
	45.50	1.99	2
	16.50	5.37	21
	18.20	4.60	30
	23.00	3.86	100
МКЦ	34.50	2.60	3
	40.20	1.89	2

рівняно з окремими субстанціями. Це можна пояснити тим, що у сумішах наявні речовини, що здатні всмоктувати вологу, яку втрачають інші речовини. Для усіх допоміжних речовин характерне початкове повільне розпадання, потім швидкість руйнування значно збільшується. Дериватограму суміші діючих і допоміжних речовин, що входять до складу гранул, надано на Рис. 1.

На диференційній кривій зміни маси при температурі 60 °C спостерігається початок перетворення, що підтверджується ендотермічним ефектом в інтервалі температур (60-185) °C із кількома максимумами при температурах 85 °C, 135 °C та 150 °C. В інтервалі температур (60-80) °C спостерігається невелика втрата в масі (близько 3 %) за рахунок втрати вологи.

Рисунок 1



Дериватограма суміші діючих речовин

Процес плавлення починається при температурі 35 °C, сягає максимуму при температурі 150 °C, втрата в масі на цьому етапі складає 12 %. При температурі 245 °C починається екзотермічний процес вигорання зразка із різкою втратою в масі, загальна втрата в масі на цьому етапі складає 35 %.

Таким чином, можна зробити висновок, що температура сушіння не має перевищувати

60 °C, у зв'язку з тим, що це найвища температура, при якій залишаються стабільними діючі речовини рослинного походження та допоміжні речовини. Для подальших досліджень було обрано три температурних режиму сушіння грануляту, що проводилося у сушильній шафі: 40 °C, 50 °C, 60 °C.

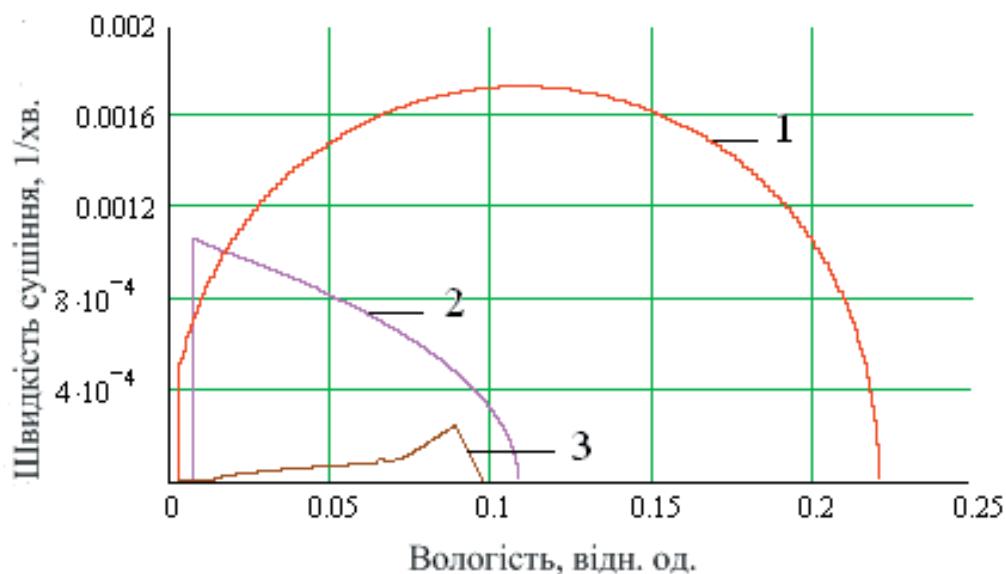
Встановлення оптимального режиму сушіння (час, температура) при якому би не відбувалося змін властивостей діючих і допоміжних речовин проводилося із використанням математичної моделі поліноміального виду, за методикою запропонованою раніше [2]. Експериментально досліджувалася втрата вологи одержаного грануляту під час сушіння при температурах 40 °C, 50 °C, 60 °C до остаточної маси зразка. На підставі отриманих результатів була визначена швидкість видалення вологи за допомогою кривої сушіння шляхом графічного диференціювання. Дані про швидкість процесу наведено на Рис. 2 у вигляді кривих швидкості.

Як бачимо, характер отриманих залежностей при температурі 40 °C відрізняється від кривих сушіння при температурах 50 °C і 60 °C. Ця відмінність свідчить, що механізм виведення вологи різний. Вигляд кривої видалення вологи при температурі 40 °C характерний для капілярно-пористих матеріалів, для яких верхня увігнута ділянка відповідає виведенню капілярної вологи, нижня — адсорбційної.

При температурах 50 °C, 60 °C спостерігається стадія нагрівання матеріалу, за якої зменшення вологи незначне; стадія видалення поверхневої вологи, за якої зменшення вологи грануляту підпорядковується лінійній залежності; стадія відділення зв'язаної вологи. Вид кривих швидкості сушіння при температурах 50 °C, 60 °C характерний для матеріалів із великою питомою поверхнею випарювання вологи. Характер досліджуваних кривих показує, що структура гранул, висушених при температурі 40 °C, відрізняється від структури гранул, висушених при температурах 50 °C, 60 °C, що також підтверджується даними термогравіметричного аналізу. Таким чином, розрахований час сушіння вологого грануляту складає при температурі 50 °C — 2.14 год, при температурі 60 °C — 1.49 год.

При розробці складу комбінованих лікарських препаратів завжди існує можливість хімічних і фізичних перетворень речовин, що входять до їх складу [4]. Тому для підтвердження незмінності структури отриманих гранул після механічної та термічної обробки нами був проведений рентгеноструктурний аналіз отриманих зразків маси для інкапсулювання.

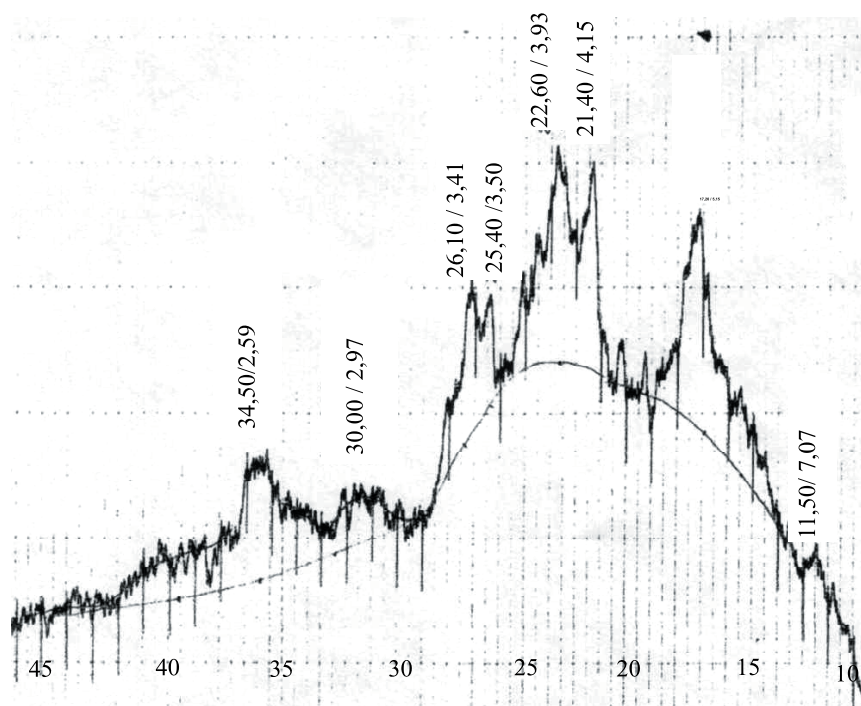
Рисунок 2



- 1 — при температурі 40 °С;
- 2 — при температурі 50 °С;
- 3 — при температурі 60 °С

Криві швидкості сушіння

Рисунок 3



Дифрактограма досліджуваного грануляту

Рентгеноструктурному аналізу піддавали діючі та допоміжні речовини, гранули, що були отримані при температурі 60 °С. У Таблиці наведено міжплощинні відстані ($d, \text{Å}$) та відносні інтенсивності відбиття компонентів лікарської форми (I_i/I_{100}).

Дифрактограми синтетичних сполук характеризуються чіткими, інтенсивними відбиттями, типовими для дрібнокристалічних речовин. При їх порівнянні видно, що кристали тіотриазоліну відрізняються більш високим ступенем структурної досконалості, ніж дипіридамолу,

де спостерігається дифузне розсіювання, що обумовлено руйнуванням структури.

Дифрактограми сухих екстрактів показали, що вони є аморфними речовинами з деякими кристалічними фрагментами, про що свідчить відсутність дифракції рентгенівських променів у діапазоні кутів $2\theta = 6\div 44^\circ$.

Аналіз крохмалю картопляного показав наявність різких дифракційних рефлексів при кутах $2\theta = 14.50^\circ; 17.30^\circ; 20.00^\circ; 22.20^\circ$, що характерно для полімерів – кристалітів. Монотонна зміна інтенсивності розсіювання рентгенівських променів у межах кутів від 7° до 12° та від 25° і далі, говорить про наявність аморфної фази у досліджуваному зразку.

Високий ступень упорядкування має зразок МКЦ, на рентгенограмі якого спостерігається виражений максимум розподілу в області $2\theta = 23^\circ$, характерний для целюлози.

Далі був проведений якісний рентгенофазовий аналіз діючих речовин у складі лікарської форми. Для цього були підготовлені зразки гранул, висушених при температурі 60°C . На дифрактограмі зразка гранул криві інтенсивності в межах $2\theta = 6\div 54^\circ$ є сумою кривих інтенсивності дифузного гало із центром при $20^\circ - 21^\circ$ та двох кристалічних відображень із $d_1 = 5.09 \text{ \AA}$ і $d_2 = 3.86 \text{ \AA}$. Це вказує на наявність у структурі зразків аморфної та кристалічної частин. Критерієм кристалічності є різкість дифракційних ліній. При порівнянні цих частин дифракційного спектру зразків гранул з еталонами нових відображень не виявлено, що вказує на відсутність хімічної взаємодії між речовинами, які входять до складу лікарської форми.

На основі проведених досліджень можна припустити, що гранулят для одержання капсул є механічною сумішшю інгредієнтів. Дослідження із підтвердження хімічного складу лікарської форми тривають.

Висновки

Із використанням дериватографічного та математичного методів обґрунтовано вибір параметрів сушіння вологого грануляту. Встановлено, що раціональною температурою сушіння є 60°C , час перебігу процесу — 1.49 год.

Вивчено хімічну незмінність діючих речовин після механічної та термічної обробки із

використанням рентгеноструктурного аналізу. Встановлено, що діючі та допоміжні речовини не зазнають хімічних перетворень при технологічній обробці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вивчення фізико-хімічних і фармакотехнологічних властивостей порошків, які володіють кардіотонічною дією / Ковалевська І.В., Рубан О.А., Чуешов В.І., Сайко І.В. // Запорозький медичний журнал. — 2008. — № 3. — С. 124 - 127.
2. Оптимизация состава смеси кардиотонического действия / Ковалевская И.В., Кутовая О.В., Шаповалов А.В., Чернов А.Н. // Тези доповідей Всеукраїнського конгресу «Сьогодення та майбутнє фармації» (16 – 19 квітня 2008 р., м. Харків). — Х.: Вид-во НФаУ, 2008. — С. 267.
3. Королев Д.В., Суворов К.А. Определение физико-химических свойств компонентов и смесей дериватографическим методом. — СПб.: СПбГТИ(ТУ), 2003. — 33 с.
4. Кузнецова Г.А. Качественный рентгенофазовый анализ: Методические указания. - Иркутск: Наука, 2005. — 27 с.

Резюме

Ковалевская И.В., Рубан Е.А., Чернов А.Н.

Изучение параметров режима сушки гранул с растительными экстрактами в комбинации с синтетическими веществами

Приведены результаты установления параметров процесса сушки гранулята для инкапсулирования и использованием математического моделирования. Расчеты проводились с помощью математического пакета MathCad. Индифферентность веществ, входящих в состав препарата, после технологической переработки доказана с помощью рентгеноструктурного анализа.

Summary

Kovalevskaya I.V., Ruban E.A., Chernov A.N.

Estimation of characteristics of the drying of granules with herbal extracts in the combination with synthetic substances

Data of the estimation of characteristics of the drying of granulated material for an incapsulation with the use of mathematical modeling were given. Accounts with the use of mathematical packet MathCad were conducted. An indifference of substances in the composition of the preparation after technological processing with the help of X-ray diffraction analysis was established.

Ковалевська Інна В'ячеславівна. Здобувач кафедри промислової фармації Національного фармацевтичного університету (НФаУ).

Рубан Олена Анатоліївна. К.фарм.н. Доцент кафедри промислової фармації НФаУ.

Чернов Андрій Миколайович. К.фарм.н. Доцент кафедри процесів і апаратів хіміко-фармацевтичного виробництва НФаУ.

Сліпченко Г.Д.

Державне підприємство „Державний науковий центр лікарських засобів”

Деякі технологічні аспекти розробки твердих лікарських форм на основі шоломниці байкальської

Розглянуто деякі технологічні підходи до створення твердих лікарських форм на основі рослинної сировини та створення нових оригінальних вітчизняних препаратів на основі шоломниці байкальської за раціональними технологіями.

Із перших днів свого існування на Землі людина, як і всяка жива істота, схильна до тяжких недуг і тому завжди намагалася використовувати для свого лікування підручні засоби, а саме рослини, що її оточували. Минали тисячоліття, а людина продовжувала досліджувати рослини, спостерігати за ними, старанно вивчаючи їх цілющі властивості. Багатотисячолітній досвід народів покладений в основу наукової лікувальної медицини, яка і понині користується речовинами лікарських рослин, властивості яких були відкриті раніше народом [1-5].

Проблема розробки нових фітопрепаратів і впровадження їх на вітчизняних виробництвах є суттєвою та актуальною в наш час.

Відомо, що терапевтична ефективність лікарського засобу залежить від багатьох факторів, у тому числі й від лікарської форми, що визначає точність дозування та спосіб застосування препарату, швидкість вивільнення лікарської речовини, компактність, умови зберігання. Тому вибір лікарської форми має виконуватися з урахуванням терапевтичних, технологічних та інших вимог.

У виборі технологічної схеми процесу одержання твердих лікарських засобів велике значення мають технологічні характеристики її компонентів та вміст діючих речовин у її складі. Особливо це стосується препаратів, у складі яких є рослинні екстракти (густі або сухі) або нативна рослинна сировина.

Метою даної роботи було вивчення основних технологічних підходів до створення нових оригінальних вітчизняних препаратів на основі шоломниці байкальської.

Технологічні підходи щодо створення твердих лікарських форм на основі рослинної сировини

Агрегатний стан діючої речовини має важливе значення для вибору допоміжних речовин. Склад допоміжних речовин і технологія одержання лікарської форми підбираються з урахуванням забезпечення оптимальних технологічних властивостей маси у процесі одержання якісної лікарської форми.

При розробці технології одержання лікарської форми для найбільш якісного виконання технологічного процесу необхідно вивчити основні технологічні властивості вихідних інгредієнтів, що входять до складу лікарської форми.

Серед технологічних властивостей кожного виду рослинної сировини (екстрактів), що використовуються, особливу увагу приділяють таким показникам, як фракційний склад, плинність, кут природного відкосу, вміст вологи.

Дослідження фармако-технологічних властивостей сухих екстрактів завжди свідчать про незадовільне значення плинності, що потребує введення формоутворюючих речовин та отримання маси із застосуванням методу вологої грануляції. В якості зв'язувальних компонентів використовують розчини полівінілпіролідону (ПВП), метилцелюлози (МЦ), крохмальний клейстер тощо.

Розглянемо вплив зв'язувальних речовин на характер плинності отриманих мас (гранул) із використанням трьох різних сухих екстрактів рослинної сировини з однаковими вихідними показниками плинності. Результати наведено на Рис. 1.

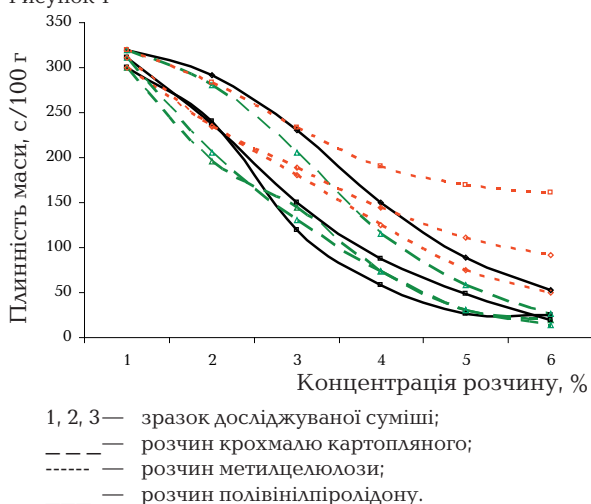
Із Рис. 1 видно, що використання зв'язувальних речовин значно поліпшило технологічні показники гранул. Виявлено закономірність щодо покращення значення плинності при збільшенні концентрації зв'язувального компонента.

Слід зазначити, що на кожен окрему суміш зв'язувальна речовина впливає індивідуально. Оптимальною зв'язувальною речовиною для суміші 1 є 10 % крохмальний клейстер зі значенням плинності 40 с/100г, для суміші 2, в якості оптимального зволожувача можна використовувати як розчин полівінілпіролідону, так і крохмальний клейстер, для суміші 3 — розчин полівінілпіролідону.

Також не менш важливим моментом технології отримання маси є міцність одержаних гранул, що впливає на кінцевий результат отримання лікарської форми як у вигляді таблеток, так і у вигляді гранул.

Із метою підвищення міцності гранул та пресованості таблеткової маси використовують целюлозу мікрокристалічну (МКЦ).

Рисунок 1

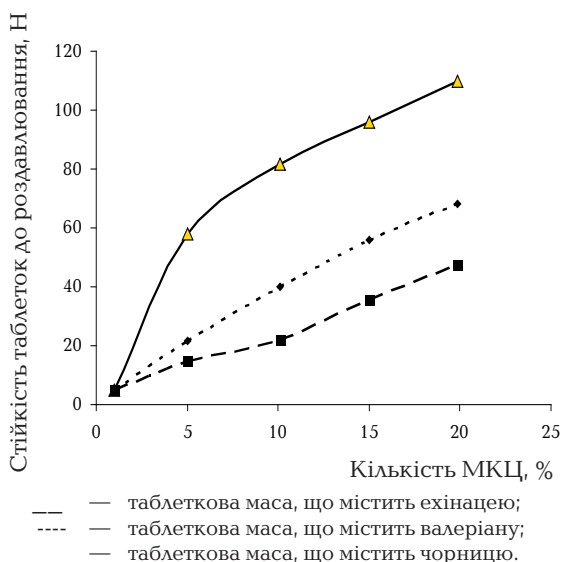


Вплив виду зв'язувальної речовини на плинність маси

Досліджено як змінювалась стійкість до роздавлення таблеток із різним вмістом МКЦ. Було виготовлено три суміші таблеткових мас, до яких входили різні види рослинної сировини із початковою плинністю не менше 30 с/100 г та низькою пресуємністю (від 15 Н).

МКЦ досліджувалась у кількості від 1 % до 20 %, у розрахунку на масу таблетки. Результати досліджень наведено на Рис. 2.

Рисунок 2



Вплив вмісту МКЦ на стійкість таблеток до роздавлення

Отримані дані показують, що збільшення вмісту МКЦ сприяє покращенню стійкості таблеток до роздавлення, але для кожної таблеткової маси вміст МКЦ індивідуальний.

Окрім перелічених допоміжних речовин, до складу можуть входити цукор молочний - для

поліпшення плинності маси; крохмаль кукурудзяний - для забезпечення оптимального розпадання; магнію стеарат, тальк та аеросил для забезпечення змащуючого та ковзного ефекту тощо. Кількість кожного компонента визначають експериментальним шляхом.

Слід зазначити, що діючі речовини рослинного походження досить чутливі до температурного фактора, а також до дії світла при зберіганні. Тому при розробці складу та технології виготовлення лікарської форми необхідно використання таких параметрів технологічних операцій і стадій виробництва, що забезпечують обережний режим отримання напівпродукту та готового препарату.

Розробка препаратів на основі шоломниці байкальської

У результаті робіт з інтродукції шоломниці байкальської *Scutellaria baicalensis* Georgi, проведених протягом багатьох років співробітниками лабораторії хімії та технології лікарських препаратів ДНЦЛЗ під керівництвом професора В.І. Литвиненка, цю рослину введено в культуру; розроблену нову технологію отримання сучасної лікарської форми — рідкого екстракту з коренів і кореневищ шоломниці байкальської. У ДУ НДІ фармакології ТНЦ СВ РАМН проведено порівняльну оцінку гіпотензивної та седативної дій рідкого екстракту з коренів шоломниці байкальської та його токсичності порівняно з настойкою та доведено його ідентичність настойці з тією перевагою, що позитивний ефект від застосування екстракту настає швидше [6, 7].

У наш час тривають подальші дослідження шоломниці байкальської. Широкого використання набуває шоломниця байкальська у складі лікувально-профілактичних препаратів у вигляді біологічно активних добавок [8].

Нами були проведені дослідження зі створення лікарських препаратів на основі шоломниці байкальської — таблеток „Скутекс“ на основі сухого екстракту підземної частини шоломниці байкальської і капсул „Скутелла“ на основі здрібнених коренів і кореневищ цієї рослини.

При створенні таблеток на основі сухого екстракту шоломниці байкальської враховували його фізико-хімічні та технологічні властивості. Необхідно було встановити кількісне співвідношення допоміжних речовин і визначити вплив кожного чинника на показники якості лікарської форми.

Проведені дослідження показали [9], що для одержання таблеток доцільно використовувати метод вологого та сухого гранулювання, а якості допоміжних речовин застосовувати крохмаль

кукурудзяний, натрію кроскармелозу, целюлозу мікрокристалічну, полівінілпіролідон, аеросил, тальк, кальцію стеарат і лактози моногідрат (гранулак 200).

Натрію кроскармелола являє собою високомолекулярну сполуку гідрофільного характеру, що через набухання її частинок у складі таблеток виконує функції розпушуючої речовини.

Наявність змащувальної речовини — кальцію стеарату - сприяє створенню пластичної плівки на поверхні прес-інструмента.

Аеросил і тальк введено до складу таблеток із метою покращення плинності маси для грануляції, вирівнювання шорсткої поверхні її частинок. За рахунок обволікування дрібносферичними частками аеросилу та тальку частинки маси для гранулювання набувають більш округлих форм, забезпечуючи при цьому більш рівномірну плинність маси.

Проведеними дослідженнями в лабораторії загальної фармакології ДНЦЛЗ під керівництвом д.мед.н., професора Г.В. Оболенцевої вивчено вплив таблеток «Скутекс» на перебіг імобілізаційного стресу (підвішування за шийну складку на 22 год) у мишей лінії СВА. Через 1 год стресу досліджували орієнтовно-дослідницьку поведінку тварин у відкритому полі, визначали ступінь вираженості стресу в балах, оцінювали виразкоутворення у шлунку, кількість лейкоцитів крові [10]. Як препарат порівняння використовували препарат «Ноотропіл» фірми «Pliva Krakow», Польща. Результати дослідження наведено в Таблиці.

Встановлено, що стрес викликає комплекс змін як у внутрішніх органах і системах, так і у поведінці. Спостерігається виразкоутворення у шлунку, лейкоцитоз; орієнтовно-дослідницька

поведінка тварин виявляється активованою з переважним зрушенням у бік амбулаторних переміщень, посилена емоційна активність. Застосування таблеток «Скутекс», так само як і препарату «Ноотропіл», попередило виникнення більшої частини змін, що викликані стресом.

Проведені дослідження показали, що для ефективного сушіння сировини доцільно розрізувати корені вздовж або раздавлювати їх. Встановлено, що найбільш доцільним способом дрібнення є вальцювання сировини до розміру частинок від 0.1 мм до 1.0 мм із насипною густиною близько 0.5 г/мл. Визначена максимальна масовіддача цільових продуктів при використанні мінімальної кількості екстрагенту у співвідношенні сировина-екстрагент 1:5. Слід зазначити, що новий препарат у формі капсул одержано з мінімальною кількістю допоміжних речовин. Використано лише кальцію стеарат у кількості 1 %.

Експериментальні дані покладено в основу створення оригінальних вітчизняних фітопрепаратів - таблеток на основі сухого екстракту шоломниці байкальської та капсул на основі дрібнених коренів і кореневищ шоломниці байкальської.

Проведені клінічні дослідження лікарських засобів підтвердили їх високу антигіпоксичну, ноотропну активність. Препарати нормалізують функціональні порушення вищої нервової діяльності, підвищують інтелектуальну активність, стимулюють процеси навчання [11, 12].

Для кожного із препаратів розроблено технологічну документацію одержання субстанцій та лікарських форм.

Таблиця

Вплив таблеток «Скутекс» і «Ноотропіл» на перебіг імобілізаційного стресу (n=12) у мишей

Група тварин	Лейкоцити, тис/мкл	Ступінь вираженості стресу, бали	Кількість виразок	Відсоток, тварин із виразками, індекс Паулса
інтактний контроль	8.01 ± 0.7	0	0	0
стрес-контроль	14.01 ± 1.2 *	12	2.3 ± 0.37 *	100 % 2.3
Скутекс, 10 мг/кг	9.2 ± 0.92 **	9	0.4 ± 0.24 **	20 % 0.08
Скутекс, 50 мг/кг	7.4 ± 0.4 **	8	0.5 ± 0.2 **	54 % 0.26
Скутекс, 200 мг/кг	9.6 ± 1.0 **	9	0.5 ± 0.16 **	50 % 0.25
Ноотропіл, 100 мг/кг	10.7 ± 0.19 **	10	0.4 ± 0.2 **	30 % 0.12

Примітки:

* — відмінності достовірні по відношенню до інтактного контролю;

** — відмінності достовірності по відношенню до стрес-контролю.

Технологічні процеси отримання зазначених препаратів захищено патентами України [13, 14].

Висновки

Розглянуто деякі підходи до створення лікарських форм на основі рослинної сировини.

Роботи, проведені в ДП ДНЦЛЗ за останні роки, дозволили створити оригінальні вітчизняні препарати на основі шоломниці байкальської за раціональними технологіями, що розширює номенклатуру комбінованих фітопрепаратів на основі даної рослинної сировини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Колесова В. Г., Марченко В. А., Сыровежко Н. В. Лекарственные растения: мифы и реальность. Традиционная (народная) медицина в объективе науки. — СПб.: СПХФА, 1998. — С. 119—121.
2. Блинков И.Л., Киселева Т.Л., Цветаева Е.В. Справочник по лечебному применению растений. - Вып. 4.- М.: Марс, 1999. — 197 с.
3. Попов А.П. Траволечебник: Лечение лекарственными травами. - СПб.: Лейла, 1998.- 558 с.
4. Захаров Ю. А. Лечение травами: В 2 кн. — М.: Школа-пресс, 1999.
5. Чжуд-ши: Канон тибетской медицины. — М.: Издательская фирма «Восточная литература» РАН, 2001. — Т. III. - С. 331—332.
6. Попова Т.П. Химическое и хемосистематическое изучение видов шлемника: Автореф. дис. ... к.фарм.н. - Харьков, 1984. -20 с.
7. Флавоноиды шлемников Сибири и Дальнего Востока / Литвиненко В.И., Попова Т.П., Воловик В.Г. и др. // Новые лекарственные препараты из растений Сибири и Дальнего Востока. - Томск, 1986. - С. 91-92.
8. Розробка нових фітохімічних препаратів на основі рослинної сировини / Сліпченко Г.Д., Литвиненко В.І., Казарінов М.О., Пашнева Р.О. // Вісник фармації. — 2007. — № 4(52). — С. 20-22.
9. Трубников Г.А., Журавлев Ю.И. Антиоксиданты в комплексной терапии больных хроническим бронхитом // Рос. мед. журн. - 1998. - № 2. - С. 38-41.
10. Растения в комплексной терапии опухолей / Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., Крылова С.Г., Гольдберг В.Е. - М.: Издательство РАМН, 2008. - 232 с.
11. Сайфутдинов Р.Р. Влияние шлемника байкальского на энергетический метаболизм головного мозга крыс при гипоксии: Автореф. дис. ... к.мед.н. - Томск, 1997. - 21 с.
12. Першина О.В. Психотропные свойства препаратов из надземной части шлемника байкальского: Автореф. Дис ... к.мед.н. - Томск, 1994. - 21 с.
13. Пат. 25423U Україна, МПК⁷. Спосіб одержання лікарського засобу з шоломниці байкальської / В.П. Георгієвський, М.О. Казарінов, Г.Д. Сліпченко, В.І. Литвиненко, та ін. (Україна). - u200703016; Заявл. 22.03.2007; Опубл. 10.08.2007.
14. Пат. 25422U Україна, МПК⁷. Засіб для поліпшення інтеграційної діяльності головного мозку / В.П. Георгієвський, М.О. Казарінов, Г.Д. Сліпченко, Р.О. Пашнева та ін.(Україна). - u200703019; Заявл. 22.03.2007; Опубл. 10.08.2007.

Резюме

Сліпченко Г.Д.

Некоторые аспекты разработки твердых лекарственных форм на основе шлемника байкальского

Рассмотрены некоторые технологические подходы к созданию твердых лекарственных форм на основе растительного сырья и создание новых оригинальных отечественных препаратов на основе шлемника байкальского по рациональными технологиям.

Summary

Slipchenko G.D.

Some technological aspects of the development of solid preparations on the basis of *Scutellaria baicalensis* Georgi.

Some technological approaches to the development of solid preparations on the basis of herbal drug and the development of new original domestic preparations on the basis of *Scutellaria baicalensis* Georgi. by efficient technologies were examined.

Сліпченко Галина Дмитрівна. К.фарм.н. Доцент кафедри заводської технології ліків НФаУ.

Фармакологічні дослідження

УДК 615.212.001.53

Крамаренко Е.А.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Сравнительная оценка фармакологического действия отечественного препарата «Парацетамол, суспензия», и препарата «Панадол Беби»

Приведены результаты экспериментальных исследований на животных специфической фармакологической активности препарата «Парацетамол, суспензия», в сравнении с референтным препаратом «Панадол Беби, суспензия» (Франция). Не установлено достоверно значимых различий в проявлении антипиретического и анальгетического действия препаратов.

Действующее вещество — парацетамол — известно уже свыше 100 лет; препараты на его основе — одни из наиболее широко применяемых лекарственных средств в мире. Благодаря сочетанию выраженных анальгетических и антипиретических свойств с высоким уровнем безопасности, парацетамол рассматривается как препарат выбора при различной интенсивности болевых синдромов и лихорадочных состояний, особенно в педиатрии и гериатрии [1-5, 7].

В соответствии с экспертизой ВОЗ (1995 год) при сравнительной оценке препаратов разных групп с сочетанным анальгетическим и антипиретическим действием по критерию «эффективность/безопасность» парацетамол получил первое место [2-6]. Практически во всех странах парацетамол относится к безрецептурным средствам и, что принципиально, более чем в 80 % всех случаев его применение осуществляется без назначения врача [2, 5, 8, 9].

Из-за его широкого использования в разных возрастных группах парацетамол выпускают в различных формах, включая капли, таблетки, таблетки-ретард, таблетки лингвальные, таблетки шипучие, каплеты, капсулы, порошки для приготовления раствора для перорального применения, сиропы, суспензии, суппозитории ректальные [2, 5, 7, 8, 10].

В настоящее время в Украине зарегистрирован препарат, содержащий парацетамол — Панадол Беби, который рекомендуется детям в возрасте от 2 месяцев до 12 лет. После его приема повышенная температура тела снижается уже через (20-30) мин.

Исследования показали, что Панадол Беби эффективно купирует у детей болевой синдром умеренной и средней степени выраженности при головной и зубной болях, невралгиях, болях при травмах и др. Как анальгетик Панадол Беби не раз апробирован также для купирования болевого синдрома у детей и после хирургических вмешательств, таких как грыжесече-

ние, коррекция крипторхизма и гипоспадии, репозиция трубчатых костей.

Важным является влияние Панадола Беби на иммунитет у детей с вирусной или бактериальной инфекцией. В отличие от анальгина, Панадол Беби не угнетает кроветворение и иммунитет, а действует как иммуномодулятор [1, 11].

В настоящее время препарат Панадол Беби рекомендован к использованию в качестве анальгетика и антипиретика у детей Институтом педиатрии, акушерства и гинекологии Академии медицинских наук Украины [11].

Отечественные препараты высокоочищенного парацетамола отсутствуют. Указанное послужило основанием к разработке и внедрению в производство на ООО «Кусум Фарм» препарата «Парацетамол, суспензия для перорального применения 120 мг/5 мл».

Целью данной работы является сравнительное изучение специфической фармакологической активности препарата «Парацетамол, суспензия», производства ООО «Кусум Фарм» и препарата «Панадол Беби, суспензия», производства фирмы «Глаксо Велком Продакшн» (Франция).

Объекты и методы

Объектом изучения являлся препарат Парацетамол, суспензия для перорального применения 120 мг/5 мл во флаконах по 100 мл производства ООО «Кусум Фарм» (серия R&D/08a/07) следующего состава: 5 мл суспензии содержат действующее вещество — парацетамол (120 мг) и вспомогательные вещества.

Исследования специфической фармакологической активности суспензии Парацетамол проводили в сравнении с препаратом Панадол Беби производства фирмы «Глаксо Велком Продакшн» (Франция).

Жаропонижающее действие препарата оценивали по его способности оказывать гипотермический эффект у животных с лихорадкой,

вызванной введением раствора молока [12]. Антипиретический эффект оценивали с помощью электротермометра контактного типа ТЦС-0.3 с датчиком для измерения ректальной температуры.

В связи с тем, что препарат планируется выпускать для педиатрической практики, при проведении эксперимента использовали половозрелых животных, самцов и самок, массой тела (35-50) г, что соответствует возрасту ребенка 1-2 года.

Животные были разделены на три группы, по 6 особей в каждой:

- 1 — позитивный контроль — модель гипертермии (МГ);
- 2 — группа животных, леченная исследуемым препаратом + МГ;
- 3 — группа животных, леченная препаратом сравнения + МГ.

Введение изучаемого препарата и препарата сравнения проводили внутривенно в разовой дозе 4.5 мл/кг массы тела за 30 мин до внутримышечного введения 3.2 % раствора коровьего молока (в дозе 0.5 мл/100 г массы тела животного). Выбор дозы осуществляли, исходя из расчетного сопоставления разовой дозы препарата для ребенка в пересчете на животных (крысят) с применением формулы Рыболовлева Ю.Р. [13].

Кроме того, учитывая данные литературы об анальгезирующем действии препарата, его эффективность оценивали на модели болевой реакции — «уксуснокислых корчей» у мышей [14].

При проведении указанного эксперимента использовали половозрелых мышей обоего пола, массой тела (18-20) г, которые были разделены на три группы, по 6 особей в каждой:

- 1 — позитивный контроль — модель уксуснокислых корчей (УК);

2 — группа животных, получавшая предварительно исследуемый препарат + УК;

3 — группа животных, получавшая предварительно препарат сравнения + УК.

Введение изучаемого препарата и препарата сравнения проводили профилактически, за 30 мин до внутривенного введения 1 % раствора уксусной кислоты (в дозе 0.1 мл/10 г массы тела животного). Препараты вводили внутривенно в максимальной суточной дозе 0.3 мл/20 г массы тела. Выбор дозы осуществляли, исходя из расчетного сопоставления максимальной суточной дозы препарата для человека (ребенка) в пересчете на животных (мышей) с применением формулы Рыболовлева Ю.Р. [13].

Эффективность действия препаратов на модели «уксуснокислых корчей» у животных оценивали в течение 20 мин наблюдения после введения химического агента (1 % раствора уксусной кислоты) по показателям времени начала «корчей» и их количеству.

Во время эксперимента с животными работали согласно правилам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986 год). Биоэтические аспекты протокола исследований одобрены Комиссией по биоэтике ГП ГНЦЛС (протокол № 17 от 12.09.06).

Все полученные в эксперименте цифровые данные обработаны методом вариационной статистики. Различия считали достоверными при значениях критерия $p \leq 0.05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Изучение жаропонижающего действия сиропа Парацетамол (Табл. 1) показало, что внутримышечное введение раствора молока крысам группы позитивного контроля вызывало у них достоверное повышение температуры

Таблица 1

Влияние препаратов Парацетамол и Панадол Беби на ректальную температуру тела крысят в условиях лихорадки, вызванной внутримышечным введением молока (n=6)

Группа животных	Ректальная температура, °С			
	исходное	через 1 ч	через 2 ч	через 3 ч
позитивный контроль — модель гипотермии (МГ)	37.38 ± 0.05	37.98 ± 0.05 *	38.60 ± 0.06 *	38.90 ± 0.14 *
Парацетамол + МГ	37.50 ± 0.05	37.57 ± 0.14 **	37.52 ± 0.16 **	37.97 ± 0.09 **
Панадол Беби + МГ	37.18 ± 0.21	37.32 ± 0.12 **	37.62 ± 0.13 **	38.03 ± 0.12 **

Примечания:

* — достоверность различия по отношению к исходным данным;

** — достоверность различия по отношению к позитивному контролю в соответствующий временной интервал наблюдения;

*** — достоверность различия по отношению к референтному препарату;

$p \leq 0.05$.

тела по отношению к исходным показателям. Указанное повышение температуры отмечалось в течение всего периода наблюдения (3 ч) и имело нарастающий характер, увеличиваясь в общей сложности от 0.6 °С (на первом часе эксперимента) до 1.52 °С (на третьем часе эксперимента).

Следовательно, внутримышечное введение молока вызывает у животных лихорадку, сопровождающуюся повышением ректальной температуры.

Профилактическое введение суспензии Парацетамол в дозе 4.5 мл/кг оказывало достоверное гипотермическое действие, способствуя снижению температуры у крысят до исходного уровня. Снижение температуры тела по отношению к показателям группы позитивного контроля к первому часу составляло 0.41 °С; ко второму часу — 1.08 °С и к третьему часу — 0.93 °С.

Аналогичный эффект наблюдался в группе животных, получавших профилактически препарат сравнения — Панадол Беби в эквивалентной дозе. Снижение температуры происходило в той же динамике, что и под действием изучаемого препарата: по отношению к показателям группы животных позитивного контроля к первому часу оно составляло 0.66 °С; ко второму часу — 0.98 °С и к третьему часу — 0.87 °С. Достоверных различий между группами животных, получавшими препараты, не установлено.

Таким образом, суспензия Парацетамол обладает выраженным антипиретическим действием, что выражается в предотвращении повышения температуры тела у крысят под влиянием внутримышечного введения молока и указанный эффект препарата сохраняется в течение 3 часов наблюдения.

На модели «уксуснокислых корчей» у мышей установлено, что суспензия Парацетамол обладает также выраженным анальгезирующим действием (Табл. 2).

Так, внутрибрюшинное введение раствора уксусной кислоты вызывало у животных судорожные сокращения брюшных мышц, сопровождающиеся вытягиванием задних конечностей и прогибанием спины. Как видно из приведенных данных (Табл. 2) в течение 20 мин наблюдения в группе позитивного контроля количество «корчей» составило 38. Первые признаки болевой реакции в группе регистрировались, в среднем, на 115 с после введения раствора уксусной кислоты.

На фоне введения препаратов болевая реакция у экспериментальных животных клинически была менее выраженной и протекала в ослабленной форме. Так, применение исследуемого препарата заметно снижало интенсивность болевой реакции: количество «корчей» снизилось до 28.67 (на 24.6 %) и время их начала регистрировалось на 286.7 с, т.е. на 171 с позже, чем в контроле. Следовательно, применение Парацетамола оказывало выраженное анальгезирующее действие.

Аналогичный эффект наблюдался в группе животных, получавших препарат сравнения — Панадол Беби в эквивалентной дозе. Различий между группами животных, получавшими препараты, не установлено.

Следует отметить, что по токсикологическим характеристикам разрабатываемый препарат также не имеет отличий от препарата Панадол Беби.

Выводы

На модели гипертермии у крысят Парацетамол, суспензия, производства ООО «Кусум Фарм» обладает антипиретическим действием, выражающимся в предотвращении повышения температуры тела у животных под влиянием внутримышечного введения молока в течение всего периода наблюдения. По указанному виду действия не выявлено различий между препаратом «Парацетамол, суспензия», производства ООО «Кусум Фарм», и препаратом сравнения — Панадол Беби, суспензия, производства фирмы «Глаксо Велком Продакшн» (Франция).

Таблица 2

Влияние препаратов Парацетамол и Панадол Беби на время возникновения и количество «уксуснокислых корчей» у мышей (n=6)

Группа животных	Количество корчей	Время начала корчей, с
позитивный контроль — модель уксуснокислых корчей (УК)	38.00 ± 1.24	115.00 ± 14.78
Парацетамол + УК	28.67 ± 1.91 *	286.67 ± 20.92 *
Панадол Беби + УК	28.50 ± 2.92 *	288.33 ± 33.41 *

Примечания:

* — достоверность различия по отношению к данным позитивного контроля;

** — достоверность различия по отношению к референтному препарату;

p≤0.05.

На модели «уксуснокислых корчей» у мышей Парацетамол, суспензия, производства ООО «Кусум Фарм» обладает анальгетическим действием, что выражается в ослаблении признаков болевой реакции (достоверном уменьшении количества «корчей») у животных и увеличении времени от момента введения химического агента до проявления первых признаков болевой реакции. По указанному виду действия не выявлено различий между препаратом «Парацетамол, суспензия» производства ООО «Кусум Фарм», и препаратом сравнения — «Панадол Беби, суспензия», производства фирмы «Глаксо Веллком Продакшн» (Франция).

Доклинические фармакологические исследования разрабатываемого и внедряемого в Украине на ООО «Кусум Фарм» суспензии Парацетамол показали его идентичность широко применяемому во всем мире препарату Панадол Беби, что является предпосылкой его высокой эффективности при клиническом применении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яблунчанский Н.И. Третий приход парацетамола // *www.medline.ru*.
2. Запруднов А.М., Харитонов Л.А. Парацетамолсодержащие препараты в педиатрической практике // *Российский вестник перинатологии и педиатрии* // *www.medline.ru*.
3. Бурчинский С.Г. Клинико-фармакологические аспекты проблемы выбора анальгетика: I. Сравнительный анализ эффективности и безопасности парацетамола // *Фармакол. вісник*. — 2000. — № 2. — С. 12-17.
4. Актуальные вопросы безопасности ненаркотических анальгетиков // *Клиническая фармакология и терапия* / Ивашкин В.Т., Фисенко В.П., Шептулин А.А., Макарьянц М.Л. — 1999. — № 5. — С. 51-54.
5. Макарьянц М.Л. Актуальные вопросы безопасности парацетамола как представителя безрецептурных анальгетиков-антипиретиков // *Клинич. медицина*. — 2003. — № 4. — С. 58-60.
6. Викторов А.П. Безопасность современных нестероидных противовоспалительных лекарственных средств // *Новости медицины и фармации*. — 2003. — № 1. — С. 18-20.
7. Бурчинский С.Г. Парацетамол как препарат выбора в гериатрической практике // *Журнал практичного лікаря*. — 2000. — № 4. — С. 36-38.
8. Рекомендации в связи с письмом ВОЗ от 18 октября 1991 г. // *Провизор*. — 1996. — № 4. — С. 13.
9. Таточенко В.К. О безопасном применении жаропонижающих средств у детей // *Детский доктор*. — 1999. — № 1. — С. 2-4.
10. Оптимизация жаропонижающей терапии у детей раннего возраста с респираторными вирусными инфекциями / Баранов А.А., Геппе Н.А., Макарьянц М.Л., Усенко В.А. // *Сучасні інфекції*. — 2000. — № 1. — С. 101-104.
11. Поленцов Ю.О. Возможности детского парацетамола // *Провизор*. — 1999. — № 19. — С. 25-28.
12. Тринус Ф.П., Клебанов Б.М., Мохорт Н.А. Методы скрининга и фармакологического изучения противовоспалительных, анальгезирующих и жаропонижающих веществ: Методические рекомендации. — К., 1974. — 27 с.
13. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // *Докл. АН СССР*. — 1979. — № 5. — С. 1513-1516.
14. Коваленко В.М., Стефанов О.В., Максимов Ю.М. Экспериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів // *Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації* / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. — Київ, 2001. — С. 302-303.

Резюме

Крамаренко О.О.

Порівняльна оцінка фармакологічної дії вітчизняного препарату «Парацетамол, суспензія» і препарату «Панадол Бебі»

Наведено результати експериментальних досліджень на тваринах специфічної фармакологічної активності препарату «Парацетамол, суспензія», порівняно з референтним препаратом «Панадол Бебі, суспензія» (Франція) у дослідях на тваринах. Не встановлено вірогідно значущих відмінностей в їх антипіретичній і анальгетичній діях.

Summary

Kramarenko E.A.

Comparative assessment of pharmacological effect of domestic preparation Paracetamol, suspension and preparation Panadol Baby

Data of experimental study on animal of specific pharmacological effect of the preparation Paracetamol, suspension in comparison with reference preparation Panadol Baby, suspension (France) were given. It was determined no reliable significant differences in antipyretic and analgetic effects of these preparations.

Крамаренко Елена Алексеевна. Ст. науч. сотр. лаборатории биохимической фармакологии ГП ГНЦЛС. К.б.н. (2005).

Мищенко О.Я., Яковлева Л.В., Кошова О.Ю.
Національний фармацевтичний університет

Оцінка імуотропної дії нового комбінованого засобу «Поллентар»

Проведено оцінку імуотропної дії комбінованого засобу «Поллентар». На першому етапі досліджували можливу імуотоксичну дію засобу за характером впливу на гуморальну і клітинну ланки імунітету, а також на масу та клітинність центральних та периферичних органів імуногенезу. На другому етапі оцінювали імуностимулювальну активність засобу у порівнянні із класичним адаптогеном (екстрактом елеутерококу) на моделі імунодефіциту, спричиненого гідрокортизоном. Встановлено, що засіб «Поллентар» в умовно терапевтичній дозі 25 мг/кг і дозі 250 мг/кг, яка перевищує умовно терапевтичну дозу у десять разів, не виявляє токсичної дії на гуморальну та клітинну ланки імунітету дослідних тварин. На моделі імунодефіциту, спричиненого гідрокортизоном, «Поллентар» в умовно терапевтичній дозі 25 мг/кг сприяв достовірному підвищенню кількості антитілоутворюючих клітин та дещо підвищував титри гемаглютининів у крові, що дозволяє констатувати його слабку імуностимулювальну дію. Класичний адаптоген (екстракт елеутерококу) в умовах пригніченої імунної відповіді виявив аналогічний ефект.

Стан адаптивних можливостей організму людини, його резистентності та рівень реактивності, що забезпечуються інтегральною взаємодією нервової, імунної, ендокринної систем та обміну речовин, у першу чергу залежить від інтенсивності енергопродукції [5]. Одним із відомих шляхів фармакологічної регуляції останньої є використання регуляторів енергетичного обміну (РЕО), зокрема бурштинової кислоти та її солей як окремо, так і в комбінації з антиоксидантами - фенольними сполуками природного походження (ФСПП), які, забезпечуючи ефективний антиоксидантний захист клітинних мембран, виявляють мембраностабілізуючі властивості [8, 9, 14, 15]. Саме поєднання енергізуючої дії РЕО та мембраностабілізуючих властивостей ФСПП дає змогу всебічно коригувати порушений гомеостаз організму та підтримувати резистентність життєво важливих органів і систем (головного мозку, серця, легень, нирок, імунної системи) до підвищених навантажень, ішемії, гіпоксії, токсичного впливу [5].

У контексті цього напрямку у ЦНДЛ НФаУ проводиться доклінічне вивчення нового комбінованого засобу «Поллентар», створеного на основі квіткового пилку (КП) та субстрата-енергізатора бурштинової кислоти (БК). За результатами попередніх досліджень встановлено, що «Поллентар» виявляє антигіпоксичну та стреспротективну активність, здатність підвищувати витривалість тварин в умовах швидкісного та силового фізичних навантажень і фізичного навантаження, ускладненого гіпоксією та гіподинамією [4]. Відомо, що БК та КП виявляють загальнозміцнювальну та імуностимулювальну дію [4, 5, 14].

Метою даною статті є оцінка імуотропної дії комбінованого засобу «Поллентар».

На першому етапі досліджували можливу імуотоксичну дію засобу за характером впли-

ву на гуморальну та клітинну ланки імунітету, а також на масу та клітинність центральних і периферичних органів імуногенезу. На другому етапі оцінювали імуностимулювальну активність засобу у порівнянні з класичним адаптогеном — екстрактом елеутерококу- на моделі імунодефіциту, спричиненого гідрокортизоном.

Матеріали та методи

Для оцінки характеру впливу засобу «Поллентар» на гуморальну і клітинну ланки імунітету, а також на масу та клітинність центральних і периферичних органів імуногенезу застосовували загальноприйняті методи [1].

Вивчення впливу засобу на масу та клітинність тимусу, селезінки, шийних лімфовузлів та кісткового мозку проводили на нелінійних мишах-самцях масою (21-32) г [1, 2]. Досліджуваний засіб вводили мишам у дозах 25 мг/кг і 250 мг/кг один раз на добу протягом 14 діб. Через 7 діб після останнього введення препарату (на 21-у добу досліду) мишей виводили з експерименту, вилучали лімфоїдні органи, зважували та визначали їх масові коефіцієнти (МК). Визначення кількості клітин та їх концентрації у зависі проводили загальноприйнятими методами [1, 2]. Кількість каріоцитів перераховували на орган та на одиницю маси (1 мг) органу.

Здатність засобу впливати на функціональну активність В-системи імунітету досліджували за рівнем гемаглютининів (ГА) у сироватці крові [1] та кількістю антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці [1, 11]. Досліди проведені на 30 нелінійних мишах-самцях масою (18.0-20.0) г. Засіб «Поллентар» вводили внутрішньошлунково у дозах 25 мг/кг і 250 мг/кг, один раз на добу за такою схемою: протягом трьох діб до імунізації; у день введення еритроцитів барана (ЕБ) та потім протягом всього періоду імунізації до дня обліку результатів. Мишей імунізували однократним внутрішньоочеревинним введенням

0.2 мл 3 % суспензії свіжовідмитих ЕБ. На 5-ту добу після імунізації визначали кількість АУК у селезінці та титри ГА у сироватці крові загальноприйнятими методами [1, 10].

Вплив засобу «Поллентар» на стан клітинного імунітету оцінювали за реакцією гіперчутливості повільного типу (ГПТ) за методом К.Р. Kitamura [1, 11]. Засіб «Поллентар» вводили за тією самою схемою і в аналогічних дозах, що й при визначенні рівня ГА та кількості АУК. Тварин імунізували однократним внутрішньоочеревинним уведенням суспензії свіжовідмитих ЕБ у дозі $2 \cdot 10^5$ клітин у 0.5 мл фізіологічного розчину на 20 г маси тіла. Для виявлення імунізації на 5-ту добу мишам під апоневротичну пластинку однієї з нижніх кінцівок (дослідна лапа) вводили завершальну дозу антигену, що склала 10^8 ЕБ у 0.02 мл фізіологічного розчину на тварину. У контрлатеральну лапу (контрольна лапа) вводили фізіологічний розчин в аналогічному об'ємі. Через 24 год оцінювали вираженість місцевої реакції за різницею у масі дослідної та контрольної лапи, розраховували для кожної тварини індекс реакції (ІР) за формулою:

$$IP = \frac{\text{маса}_{\text{дослідної лапи}} - \text{маса}_{\text{контрольної лапи}}}{\text{маса}_{\text{контрольної лапи}} \times 100}$$

Стан імунодефіциту моделювали внутрішньоочеревинним однократним уведенням гідрокортизону ацетату («Hydrocortison-Richter», Будапешт – Угорщина) у дозі 250 мг/кг нелінійним мишам-самцям масою (18.0-22.0) г. Досліджувані засоби: «Поллентар» у дозі 25 мг/кг та препарат порівняння екстракт елеутерококу у

дозі 1 мл/кг вводили за 10 діб до відтворення імунодефіциту та протягом всього періоду експерименту до дня визначення показників імунної відповіді. Препарат порівняння використовували в дозі, що найбільш часто використовується в експериментальних дослідженнях [7]. Імунізацію тварин проводили за вищенаведеною схемою на 6-ту добу після введення гідрокортизону ацетату (ГК). Кількість АУК у селезінці та ГА у сироватці крові мишей визначали на 5-ту добу після імунізації.

Отримані експериментальні дані статистично обробляли методами однофакторного дисперсійного аналізу та методом Крускал-Уолліса для даних, що не підлягають нормальному розподілу, за допомогою стандартного пакета статистичних програм «Statistica 6.0» [6]. Експериментальні дані з визначення МК, клітинності органів і кількості АУК виражали через середнє арифметичне та його стандартну похибку. Для отримання статистичних висновків щодо достовірності застосовували критерії Ньюмана-Кейлса і Fisher LSD test. Значення індексу реакції та титрів ГА контрольних і дослідних груп виражали через середнє арифметичне та нижній і верхній квантилі ($Me (Q25-Q75)$), порівнювали за допомогою критерію U Вілкоксона Манна-Уїтні. При застосуванні методів математичної статистики був прийнятий рівень значущості $p < 0.05$.

Утримання тварин та всі маніпуляції з ними здійснювали згідно із санітарно-гігієнічними нормами та принципами Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин [10].

Таблиця 1

Впливу засобу «Поллентар» на масу та клітинність органів імуногенезу мишей, (n = 10)

Орган імуногенезу	Досліджуваний показник	Група тварин		
		інтактний контроль	Поллентар, 25 мг/кг	Поллентар, 250 мг/кг
кістковий мозок	клітинність ($\times 10^6$ /масу органу)	114.68 \pm 2.99	119.38 \pm 6.80* (p=0.01)	88.37 \pm 7.82* (p=0.01)
тимус	МК	0.20 \pm 0.01	0.22 \pm 0.027	0.16 \pm 0.023* (p=0.09)
	клітинність ($\times 10^6$ /1 мг тканини)	0.43 \pm 0.057	0.55 \pm 0.083	0.39 \pm 0.076
шийні лімфовузли	МК	0.24 \pm 0.012	0.25 \pm 0.023	0.025 \pm 0.03
	клітинність ($\times 10^6$ /1 мг тканини)	0.68 \pm 0.063	0.89 \pm 0.10*/** (p=0.01)	1.57 \pm 0.19* (p=0.004)
селезінка	МК	1.06 \pm 0.19	0.53 \pm 0.04* (p=0.02)	0.71 \pm 0.04* (p=0.015)
	клітинність ($\times 10^6$ /1 мг тканини)	0.732 \pm 0.083	0.810 \pm 0.11	0.830 \pm 0.12

Примітки:

* — відмінності достовірні відносно значень інтактного контролю;

** — відмінності достовірні відносно значень групи тварин, які отримували засіб «Поллентар» у дозі 250 мг/кг;

n — кількість спостережень.

Результати досліджень та їх обговорення

Враховуючи, що активність імунної системи залежить від її функціонального стану, дослідження імунотропної дії засобу „Поллентар” починали з вивчення впливу на масу та клітинність центральних і периферичних органів імуногенезу. Повноцінність функціонування лімфоїдної системи на тлі тривалого застосування засобу «Поллентар» оцінювали за показником МК лімфоїдних органів та за насиченістю їх клітинними елементами.

Як показали проведені дослідження (Табл. 1), засіб «Поллентар» у дозах 25 мг/кг і 250 мг/кг викликав зменшення масових коефіцієнтів селезінки та тимусу, але ці зміни не вплинули негативно на клітинність цих органів: кількість спленоцитів і тимоцитів залишалася на рівні інтактного контролю. У той же час спостерігали достовірне підвищення кількості каріоцитів (клітин кісткового мозку) та лімфоцитів шийних лімфовузлів. Найбільш виражені зміни реєструвалися у групі тварин, яким вводили «Поллен-

тар» у дозі 250 мг/кг, що перевищує умовно терапевтичну дозу у десять разів (Табл. 1). Аналіз отриманих даних дозволяє зробити висновок як про активацію утворення імунокомпетентних клітин, так і про посилення їх рециркуляції під впливом комбінованого засобу.

Із наведеним висновком узгоджуються і результати визначення кількості антитілопродуцентів селезінки. Як видно з даних, наведених у Табл. 2, кількість АУК на тлі введення засобу «Поллентар» у дозі 25 мг/кг має тенденцію до підвищення, а при застосуванні дози 250 мг/кг це збільшення набуває достовірного характеру, але титри ГА залишалися незмінними. Наведене є свідченням деяких стимулювальних властивостей засобу „Поллентар” щодо антитілогенезу та відсутності токсичної дії на гуморальну ланку імунної системи мишей. Крім того, чітка стимуляція утворення АУК у селезінці мишей, імунізованих ЕБ, при введенні засобу в дозі 250 мг/кг без підвищення загальної кількості спленоцитів, можливо, свідчить про

Таблиця 2

Вплив засобу «Поллентар» на кількість АУК селезінки та ГА сироватки крові у мишей при первинній імунній відповіді

Група тварин	n	Кількість АУК на селезінку	n	Титри ГА, Log ₂ (Ме (Q25–Q75))
імунізований контроль	6	22533.33±5577.73	10	8.00 (7.0-8.0)
Поллентар, 25 мг/кг	8	24800.00±3110.76	10	8.00 (8.0-9.0)
Поллентар, 250 мг/кг	6	36934.67±4484.48*/**	10	9.00 (8.0-9.0)

Примітки:

- * — відмінності достовірні відносно значень імунізованого контролю, p≤0.05;
- ** — відмінності достовірні відносно значень тварин, яким вводили засіб „Поллентар” у дозі 25 мг/кг, p≤0.05;
- n — кількість спостережень.

Таблиця 3

Вплив засобу «Поллентар» на перебіг реакції ГПТ

Група тварин	Індекс реакції	
	n	Ме (Q25–Q75)
неімунізований контроль	5	2.50 (1.19-3.90)
імунізований контроль	6	7.59 (6.67-7.91)*
Поллентар, 25 мг/кг	7	6.17 (0.64-9.42)
Поллентар, 250 мг/кг	8	6.24 (3.78-9.54)*

Примітка.

- * — відмінності достовірні відносно значень неімунізованого контролю, p≤0.05.

Таблиця 4

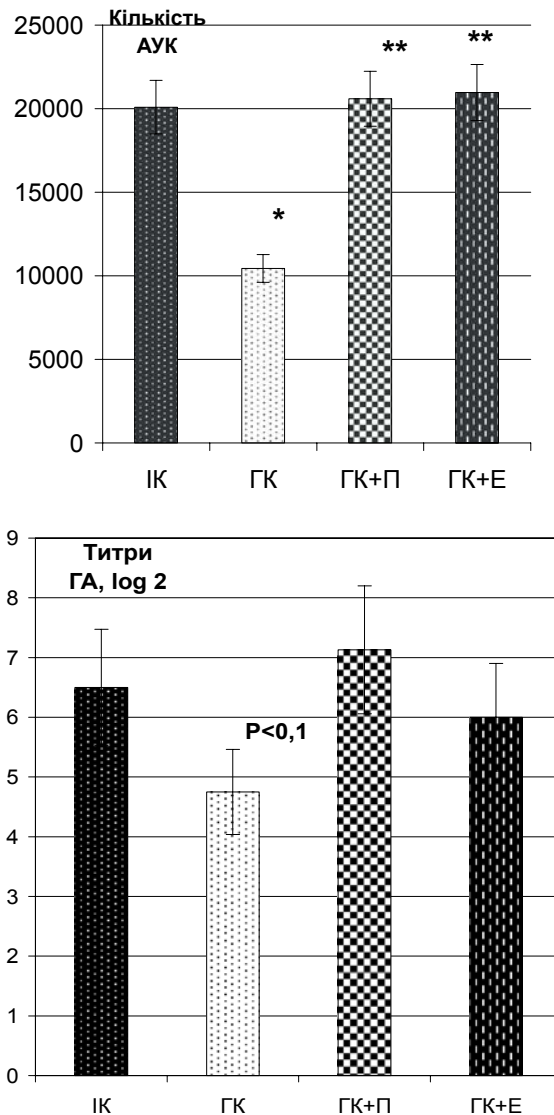
Масові коефіцієнти органів імуногенезу мишей з імунодефіцитом, спричиненим гідрокортизоном

Орган імуногенезу	Група тварин			
	імунізований контроль (n=7)	імунізація + гідрокортизону ацетат		
		контроль патології (n=6)	«Поллентар» (n=7)	екстракт елеутерококу (n=6)
селезінка	0.91±0.16	1.06±0.25	0.94±0.13	0.56±0.17
тимус	0.19±0.03	0.12±0.02	0.14±0.02	0.13±0.02

Примітка.

- n — кількість тварин у групі.

Рисунок



- * — відмінності достовірні відносно значень імунізованого контролю, $p < 0.05$;
 ** — відмінності достовірні відносно значень контрольної патології, $p < 0.05$;
 P<0.1 — тенденція відмінностей відносно групи імунізованого контролю;
 ІК — імунізований контроль;
 ГК — імунізований контроль + гідрокортизону ацетат;
 ГК + П — засіб «Поллентар» на тлі гідрокортизону ацетату;
 ГК + Е — екстракт елеутерококу на тлі гідрокортизону ацетату;
 кількість тварин у групах — 5.

Вплив засобу «Поллентар» на розвиток імунодефіциту, спричиненого введенням гідрокортизону ацетату

слабко виражену здатність досліджуваного об'єкта неспецифічно активувати проліферацію лімфоїдних клітин.

Результати дослідження впливу засобу на функціональну активність Т-клітин — ефекторів реакції ГПТ наведено у Табл. 3. Дослідження дає змогу оцінити вплив досліджуваного засобу на виробку сенсibilізованими лімфоцитами — ефекторами медіаторів, що спричинюють інфільтрацію тканини клітинними елементами. У відповідь на введення попередньо імунізованим мишам під апоневротичну пластинку лапки завершальної дози антигену спостерігали розвиток локального набряку. Індекс реакції (ІР) у цій групі достовірно збільшувався у три рази відносно тварин неімунізованого контролю. При введенні засобу «Поллентар» у дозах 25 мг/кг і 250 мг/кг ІР достовірно не відрізнявся від імунізованого контролю, що свідчить про відсутність у досліджуваного об'єкта токсичних властивостей щодо Т-клітинної ланки імунітету експериментальних тварин.

Отже, результати першого етапу дослідження свідчать про відсутність токсичної дії засобу «Поллентар» на гуморальну і клітинну ланки імунітету дослідних тварин у дозах 25 мг/кг і 250 мг/кг. Стимулювання «Поллентаром» у дозі 250 мг/кг, що перевищує умовно терапевтичну у десять разів, утворення АУК у селезінці мишей, імунізованих ЕБ, без підвищення загальної кількості спленоцитів, ймовірно, свідчить про слабо виражені властивості досліджуваного об'єкта неспецифічно активувати проліферацію лімфоїдних клітин та про потенційні імуностимулювальні властивості препарату в дозі 250 мг/кг. Визначення імунокоригувальних властивостей засобу «Поллентар» у порівнянні з класичним адаптогеном — екстрактом елеутерококу - на моделі гідрокортизону імунодефіциту й було предметом подальших досліджень.

Отримані результати (Табл. 4, Рисунок) свідчать, що введення гідрокортизону спричинило значне падіння активності гуморальної ланки імунної системи, на що вказує достовірно нижча кількість АУК у селезінці та тенденція до зниження ГА у сироватці крові дослідних мишей (Рисунок). Введення комбінованого засобу «Поллентар» за умов імуносупресії сприяло відновленню реакцій гуморальної ланки імунітету, про що свідчило достовірне підвищення кількості АУК у цій групі тварин до рівня інтактних тварин. Аналогічний вплив засобу відмічали й на утворення ГА, проте він не носив достовірного характеру. Слід зазначити, що комбінований засіб виявив активність на рівні препарату порівняння — класичного адаптогену з імуностимулюючими властивостями — екстракту елеутерококу. Коригуючий вплив засобу «Поллентар» на пригнічені процеси антитілоутворення,

можливо, пояснюється здатністю нормалізувати процеси енергоутворення імунокомпетентних клітин, стабілізації їх мембран та, як наслідок, рецепторного апарату, завдяки енергізуючим та антиоксидантним властивостям [3].

Висновки

Засіб «Поллентар» в умовно терапевтичній дозі 25 мг/кг і дозі 250 мг/кг, що перевищує умовно терапевтичну у десять разів, не виявляє токсичної дії на гуморальну та клітинну ланки імунітету дослідних тварин.

Встановлено, що засіб активує утворення імунокомпетентних клітин і посилює їх рециркуляцію.

На моделі імунодефіциту, спричиненого гідрокортизоном, «Поллентар» в умовно терапевтичній дозі 25 мг/кг сприяв достовірному підвищенню кількості антитілоутворюючих клітин та дещо підвищував титри гемаглютининів у крові, що дозволяє констатувати його слабку імуностимулювальну дію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вивчення імунотоксичної дії лікарських засобів / Бутенко Г.М., Терешіна О.П., Максимов Ю.М., Аркадьєв В.Г та ін. // Доклінічні дослідження лікарських засобів / Метод. рекомендації за ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова — К.: Авіцена, 2001. — С. 102-114.
2. Лимфоциты: Методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж.Клауса. — М.: Мир, 1990. — 395 с.
3. Мищенко О.Я. Доклінічне дослідження адаптогенних властивостей і токсикологічних характеристик нового засобу поллентар // Сб. мат. XV Рос. нац. конгреса «Человек и лекарство» (14-18 апреля 2008 г., Москва). — Москва, 2008. — С. 670.
4. Пыльца цветочная (обножка пчелиная) в фармации и медицине (теория, технология, медицинское применение): Монография / Тихонов А.И., Создзавичный К., Тихонова С.А. и др. / Под ред. А.И. Тихонова. — Х.: Изд-во НФаУ; Оригинал, 2006. — 308 с.
5. Регуляторы энергетического обмена: Материалы симпозиума / Под ред. В.А. Хазанова — Томск: Изд-во Томского ун-та, 2002. — 78 с.
6. Салимов Р.М. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов / Руководство по экспериментальному (доклінічному) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Ремедиум, 2000. — С. 349-454.
7. Федоров В.Н. Фармакодинамика адаптогенов: экспериментальное и клиническое исследование: Автореф. дис. ... д.мед.н. - М., 1999. - 47 с.
8. Bent H. Havsteen. The biochemistry and medical significance of the flavonoids // Pharmacology and Therapeutics. — 2002. - Vol. 96. — P. 167-202.
9. Superoxide scavenging by polyphenols: effect of conjugation and dimerization / Cano A, Arnao M.B, Williamson G, Garcia-Conesa M.T. // Redox Rep. - 2002. - № 7. - P. 379-83.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. - Strasbourg, 1986. — № 123. - P. 52.
11. Jerne K.N., Nordin A.A. Plaque formation by single antibody-producing cells // Science. - 1963. - Vol. 140. - P. 405-406.
12. Kitamura K. A foodpad weigh assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse // J. Immunol. Methods. - 1980. - Vol. 39. - P. 277-283.
13. Minckley R.L., Cane J.H., Kervin L. Origins and ecological consequences of pollen specialization among desert bees // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. - 2000. - Vol. 267, № 1440. - P. 265-271.
14. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes / Liu G.T., Zhang T.M., Wang B.E., Wang Y.W. // Biochemical Pharmacology. - 1992. — Vol. 43, № 2. — P. 147—152.
15. Wagner H., Amason J.T. Immunostimulants and adaptogens from plants. // Phytochemistry of Medicinal Plants. - New York: Plenum Press, 1995. - P. 1-18.

Резюме

Мищенко О.Я., Яковлева Л.В., Кошевая Е.Ю.

Оценка иммуотропного действия нового комбинированного средства «Поллентар»

Проведена оценка иммуотропного действия комбинированного средства «Поллентар». На первом этапе исследовали возможное иммуотоксическое действие средства по характеру влияния на гуморальное и клеточное звено иммунитета, а также на массу и клеточность центральных и периферических органов иммуногенеза. На втором этапе оценивали иммуностимулирующую активность средства в сравнении с классическим адаптогеном (экстракт элеутерококка) на модели иммунодефицита, вызванного гидрокортизоном. Установлено, что средство «Поллентар» в условно терапевтической дозе 25 мг/кг и дозе 250 мг/кг, превышающей условно терапевтическую в десять раз, не оказывает токсического действия на гуморальное и клеточное звено иммунитета исследуемых животных. На модели иммунодефицита, вызванного гидрокортизоном, «Поллентар» в условно терапевтической дозе 25 мг/кг способствовал достоверному повышению количества антителообразующих клеток и незначительно повышал титры гемаглютининов в сыворотке крови, что позволяет констатировать его слабое иммуностимулирующее действие. Классический адаптоген (экстракт элеутерококка) в условиях угнетенного иммунного ответа оказывает аналогичный эффект.

Summary

Mischenko O.Ya., Yakovleva L.V., Koshevaya E.Y.

Estimation of immunotropic effect of new combined drug Pollentarum

The estimation immunotropic effect of combined drug Pollentarum was conducted. At the first stage possible immunotoxic effect of drug on influence on humoral and cellular part of immunity, and also on mass and cellular of central and peripheral part of immunogenesis were investigated. At the second stage immunostimulating effect of drug in comparison with classical adaptogen (eleutherococcus extract) on hydrocortisone caused immunodeficiency model was estimated. Pollentarum in conditionally therapeutic dose 25 mg/kg and dose 250 mg/kg, exceeding conditionally therapeutic dose ten times, did not have toxic effect on humoral and cellular parts of immunity of experimental animals. On hydrocortisone caused immunodeficiency model, Pollentarum in conditionally therapeutic dose 25 mg/kg promoted poorly increase antibodyforming cells count and slightly raised agglutinins titre in blood; that allowed to ascertain its weak immunostimulating effect. Classic adaptogen (eleutherococcus extract) in conditions of suppressive immune answer had similar effect.

Мищенко Оксана Яківна. Ст. наук. співр. Доцент кафедри фармакоеконіміки НФаУ. К.фарм.н.

Яковлева Лариса Василівна. Завідувачка центральною науково-дослідною лабораторією Національного фармацевтичного університету. Д.фарм.н. Професор.

Кошова Олена Юрївна. Мол. наук. співр. ЦНДЛ. НФаУ.

Демидяк О.Л., Марчишин С.М., Яковлева Л.В., Кошова О.Ю.
Національний фармацевтичний університет
Тернопільський державний медичний університет

Вплив рідких екстрактів різних видів арніки на перебіг гострого ексудативного запалення, індукованого карагеніном

Наведено результати з вивчення антиексудативних властивостей рідких екстрактів арніки гірської та арніки листяної родини *Asteraceae* за умов гострого ексудативного запалення лапи у щурів, індукованого карагеніном. Протизапальні властивості рідких екстрактів вивчали у діапазоні доз (25-100) мг/кг. Показано, що найбільшу активність екстракти виявляють у дозі 75 мг/кг (36 % і 40 %, відповідно). Виражена протизапальна дія екстрактів реалізується через наявність у їх складі значної кількості БАР (поліфенолів, флавоноїдів, ефірних олій). Отримані результати обумовлюють доцільність подальших фармакологічних досліджень рідких екстрактів арніки.

Україна є регіоном, багатим на запаси сировини різноманітних видів дикорослих трав, що пов'язано з її сприятливими природно-кліматичними умовами. Привабливість використання лікарських рослин як джерела отримання лікувальних і профілактичних засобів у сучасній медицині пояснюється широтою їх фармакологічної дії, що забезпечується наявністю різноманітних біологічно активних речовин (БАР), меншою токсичністю (у більшості випадків) та більшою фізіологічною спорідненістю до організму людини.

Із цієї точки зору привертають до себе увагу рослини роду арніка (*Arnica L.*) родини *Asteraceae*. Арніка гірська (*Arnica montana L.*) широко використовується у народній медицині як ефективний засіб при маткових кровотечах, стенокардії, міокардітах, гіпертонічній хворобі, після мозкових крововиливів, для швидкого відновлення функціонального стану центральної нервової системи та є єдиним представником роду *Arnica L.* у флорі України, що росте у дикому стані. Даний вид поширений на території Українських Карпат, зрідка трапляється на Українському Поліссі — в околицях м. Сарни (Рівненська область) та Овруцькому районі Житомирської області [5, 9]. В офіційній медицині препарати з арніки виготовляють майже у 30 країнах світу [7]. Препарати арніки гірської виявляють кровоспинні, жовчогінні, протисклеротичні, антимікробні та бактеріостатичні властивості, застосовуються для лікування наслідків травм, опіків і відморожень, при переломах кісток та вивихах суглобів [2]. На сучасному етапі арніку віднесено до переліку найперспективніших лікарських рослин [2]. Але заготівля сировини цієї рослини дуже обмежена у зв'язку з занесенням цього виду до Червоної книги України [9].

У 80-х роках минулого століття в Україні введена в культуру й успішно культивується на території Західного Поділля арніка листяна

(*Arnica foliosa Nutt.*) [4]. Однак, практичне використання культивованих видів арніки, зокрема арніки листяної, як сировини для одержання препаратів потребує додаткових досліджень їх фармакологічних властивостей.

Метою даної роботи є вивчення впливу рідких екстрактів арніки гірської та арніки листяної на розвиток гострого ексудативного запалення стопи щурів.

Матеріали і методи

Досліди проведено на білих нелінійних щурах масою (180-200) г. Об'єктами дослідження були 1.0 % рідкий екстракт арніки гірської та 1.5 % рідкий екстракт арніки листяної. Антиексудативні властивості досліджуваних екстрактів вивчали на моделі гострого запалення стопи у щурів, спричиненого субплантарним уведенням у задню лапу тварини 0.1 мл 1 % розчину карагеніну (фірма «Sigma») [3]. Як препарат порівняння був обраний «Ортофен-ЗТ» у дозі 8 мг/кг (ЕД₅₀ на даній моделі) — препарат групи НПЗЗ із вираженим антиексудативним компонентом у виявленні протизапальної дії. Досліджувані екстракти та препарат порівняння вводили внутрішньошлунково одноразово, за одну годину до індукування локального запалення. Тваринам групи позитивного контролю вводили еквівалентну їх масі кількість води.

Проводили дві серії експериментів. У першій серії вивчали протизапальну активність екстракту арніки листяної, у другій — екстракту арніки гірської. Про розвиток набряку судили за збільшенням товщини лапи, яку вимірювали у динаміці: вихідну товщину і через 1 год, 2 год, 3 год, 4 год та 6 год після введення флогогенного агенту, за допомогою механічного онкометра. Протизапальну активність (А) оцінювали за ступенем зменшення набряку лапи у тварин, які отримували препарати, у порівнянні із тваринами групи позитивного контролю, та виражали у відсотках. Отримані експериментальні

дані статистично обробляли методом варіаційної статистики (критерій Манна-Уїтні для даних, що не підлягають нормальному закону розподілення [8]) за допомогою стандартного пакета статистичних програм «Statistica 6.0». Утримання тварин та всі маніпуляції з ними здійснювали згідно з санітарно-гігієнічними нормами та принципами Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин [6].

Результати досліджень та їх обговорення

Як показали проведені дослідження, субплантарне введення карагеніну щурам викликало приріст товщини стопи протягом всього терміну спостереження через поступове вивільнення різних медіаторів, що беруть участь у розвитку запальної реакції. У роботах Di Rosa M. зі співавт. показано, що у перші (30-90) хв розвитку набряку активно вивільняються гістамін і серотонін, в інтервалі між (1.5-2.5) год — кініні, між (2.5-5.5) год — простагландини [3, 12]. Максимальний набряк стопи щурів групи позитивного контролю розвивався на (3-4) год експерименту (Таблиця).

Результати вивчення протизапальної активності екстрактів арніки листяної та арніки гірської на моделі карагенінового набряку (Таблиця) свідчать, що найбільшу протизапальну

дію обидва досліджувані об'єкти виявляють у дозі 75 мг/кг у період максимального розвитку запалення. Достовірне зниження набряку стопи тварин, які отримували екстракти у дозі 75 мг/кг, починається від (2-3) год і триває протягом всього терміну спостереження. Середня протизапальна активність екстрактів арніки гірської і листяної у дозі 75 мг/кг становила (36 – 40) %. У дозі 50 мг/кг екстракти виявили помірні антиексудативні властивості. А у дозах 25 мг/кг і 100 мг/кг антиексудативної дії майже не встановлено. Аналіз динаміки протизапальної дії екстрактів арніки листяної та арніки гірської дає можливість припустити наявність у механізмі антиексудативної дії досліджуваних об'єктів здатності до гальмування вивільнення простагландинів через наявність у їх складі флавоноїдів, поліфенолів, ефірної олії, що, за даними літератури, виявляють протизапальні властивості [1, 11].

Під впливом препарату порівняння ортофену простежувалась регресія набряку з вірогідною розбіжністю від позитивного контролю протягом всього терміну спостереження (Таблиця). Взагалі, за вираженістю протизапальної дії жоден із рослинних екстрактів не досягав ефективності інгібітора циклооксигенази, активність якого становила (53-56) %.

Таблиця

Вплив рідких екстрактів арніки на розвиток гострого запалення стопи щурів, індукованого карагеніном (n=6)

Група тварин	Доза, мг/кг	Товщина лапи, $\Delta V (\bar{X} (\text{min-max}), \text{ум.од.})$					
		1 год	2 год	3 год	4 год	6 год	середня А, %
<i>перша серія дослідів</i>							
позитивний контроль	—	8.0 (5-12)	12.0 (7-18)	14.3 (11-19)	14.0 (11-18)	10.7 (11-14)	-
екстракт арніки листяної	25	8.7 (6-10)	11.5 (10-13)	12.5 (6-16)	12.2 (6-17)	8.2 (2-13)	9
	50	1.3 (0-4) *	11.5 (9-16)	14.0 (11-17)	12.2 (11-15)	8.0 (7-11) *	26
	75	6.5 (2-13)	9.7 (4-13)	9.87 (7-12) <small>p≤0.055</small>	5.3 (1-11) *	3.7 (1-9) *	40
	100	8.2 (6-11)	10.8 (8-15)	10.7 (7-14) <small>p≤0.078</small>	12.0 (7-18)	8.5 (3-13)	15
Ортофен-ЗТ	8	7.5 (5-12)	7.2 (3-10)	5.0 (3-7) *	4.8 (0-9) *	1.3 (0-3) *	53
<i>друга серія дослідів</i>							
позитивний контроль	—	9.0 (7-11)	13.5 (11-16)	12.8 (9-17)	13.6 (9-14)	10.5 (6-18)	-
екстракт арніки гірської	25	8.8 (7-10)	15 (12-18)	14.7 (13-18)	12.7 (10-16)	8.2 (4-14)	3
	50	9.7 (9-11) *	11.5 (6-15)	11.2 (5-16)	8.5 (6-10) *	6.7 (4-9) <small>p≤0.089</small>	19
	75	7.3 (8-10)	8.7 (4-13) *	9.3 (2-14)	6.3 (1-13) *	5.7 (1-9) *	36
	100	8.3 (7-13)	10.3 (6-15) <small>p≤0.066</small>	12.8 (8-16)	11.5 (7-15)	9.3 (5-12)	12
Ортофен-ЗТ	8	6.5 (4-8) *	9 (6-11) *	3.2 (1-5) *	4 (1-5) *	2.3 (0-5) *	56

Примітка.

* - відмінності достовірні відносно групи тварин позитивного контролю, p<0.05.

Таким чином, на моделі карагенінового набряку встановлені однакові за динамікою та вираженістю антиексудативні властивості екстрактів арніки листяної та арніки гірської. Отримані результати обумовлюють доцільність подальшого фармакологічного вивчення екстрактів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. — М.: Наука, 1984. — 160 с.
2. Гарник Т.П., Вихтинская И.Л., Исакова Т.И. Обзор официального и перспективного лекарственного растительного сырья // Фитотерапия в Україні. — 1998. — № 1. — С. 10-15.
3. Експериментальне (доклінічне) вивчення фармакологічних речовин, які пропонуються як нестероїдні протизапальні засоби / Дроговоз С.М., Зупанець І.А., Мохорт М.А., Яковлева Л.В., Клебанов Б.М. // Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / За ред. чл.кор. АМН України Стефанова О.В. — Київ, 2001. — С. 292-306.
4. Марчишин С.М. Вирощування арніки листяної в умовах Тернопільської області // IX з'їзд Українського ботанічного товариства: Тези доповідей. — К.: Наукова думка, 1992. — С. 216-217.
5. Мінарченко В.М., Тимченко І.А. Атлас лікарських рослин України. — К.: Фітосоціоцентр, 2002. — С. 15-17.
6. 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.
7. Нестерчук Ю. Рослинний світ Українських Карпат: Чорногора. — Львів: БАК, 2003. — С. 356-357.
8. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М.: Ремедиум, 2000. — С. 349-354.
9. Собко В.Г. Стежинами Червоної книги. — 2-е вид., доп. — К.: Урожай, 2007. — С. 32-34.
10. Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология: Руководство для врачей. - М.: Медицинское информационное агентство, 2000. — С. 331-333.
11. Robak Jadwiga, Gryglevski Ryszara J. Bioactivity of flavonoids // Pol. J. Pharmacol. — 2000. — Vol. 48, № 6. — P. 555-564.
12. Di Rosa M., Giroud J.P., Willoughby D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carragenin and turpentine // J. Pathol. - 1971. - Vol. 104, № 15. — P. 29.

Резюме

Демидяк О.Л., Марчишин С.М., Яковлева Л.В., Кошова Е.Ю.

Влияние водных экстрактов разных видов арники на течение острого эксудативного воспаления, индуцированного каррагенином

Представлены результаты изучения антиексудативных свойств водных экстрактов арники горной и арники

лиственной семейства *Asteraceae* на модели острого эксудативного воспаления стопы крыс, индуцированного каррагенином. Противовоспалительные свойства водных экстрактов изучали в диапазоне доз (25-100) мг/кг. Показано, что наибольшую активность экстракты проявляют в дозе 75 мг/кг (36 % и 40 %, соответственно). Выраженное противовоспалительное действие экстрактов реализуется за счет наличия в их составе БАВ (полифенолов, флавоноидов, эфирных масел). Полученные данные обуславливают целесообразность дальнейшего фармакологического изучения водных экстрактов арники.

Summary

Demydyak O.L., Marchyshyn S.M., Yakovleva L.V., Koshevaya O.U.

Influence of aqueous extracts of different kinds of arnica on the development of carrageenin-induced acute exudative inflammation

Data of the study of antiexudative properties of aqueous extracts of *Arnica montana* and *Arnica foliosa* of *Asteraceae* family on the model of acute exudative inflammation of rat's foot, induced by carrageenin, were given. Anti-inflammatory effects of aqueous extracts in the doses (25-100) mg/kg were studied. It was shown, that maximum activity of extracts were in doses 75 mg/kg (36 % and 40 %, correspondingly). Expressed anti-inflammatory effect of extracts was realized at the expense of the presence in their content of biologically active substances (polyphenols, flavonoids and essential oils). Obtained data showed an expediency of farther pharmacological study of arnica's aqueous extracts.

Демидяк Ольга Люτισлавівна. Ст. лаборант кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського.

Марчишин Світлана Михайлівна. К.фарм.н. Професор каф. фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського.

Яковлева Лариса Василівна. Д.фарм.н. Професор. Зав. Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету.

Кошова Олена Юр'ївна. Мол. наук. співр. Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету.

Техніко-економічні та маркетингові дослідження

УДК 615.457:339.13(100)

Пивень Е.П., Андрюкова Л.Н.

Национальный фармацевтический университет

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Современное состояние и перспективы развития рынка офтальмологических препаратов на примере деятельности ведущих зарубежных фармацевтических компаний

Исследованы мировые тенденции в области создания и производства офтальмологических препаратов на примере деятельности ведущих зарубежных фармацевтических компаний. Проведен анализ товарной структуры рынка глазных капель. Установлены основные принципы формирования товарного ассортимента ведущих офтальмологических компаний. Определены перспективные направления создания новых офтальмологических препаратов в форме глазных капель.

До последнего времени мировой рынок офтальмологических препаратов переживал период бурного роста. Так, если в 2000 году объем рынка офтальмологических препаратов составлял \$3.7 млрд., то уже в 2006 году превысил \$6 млрд. при ежегодном приросте 9 % [1-6].

Аналитики, работающие в области фармацевтической промышленности, прогнозируют, что объем мирового рынка офтальмологических препаратов в течение следующих пяти лет возрастет более чем на \$2 млрд., причем его рост будет обусловлен множеством факторов, включая демографические тенденции (прежде всего, старение населения и, соответственно, повышение потребности в лекарственных средствах), достижения медицинской технологии, совершенствование методов лечения и, в частности, фармакотерапии.

По оценкам экспертов компании Vausch & Lomb (США), мировой рынок офтальмологических препаратов распределяется следующим образом (динамика роста по отдельным группам приведена в скобках) [5-7]:

- противоглаукомные препараты — 45 % (2-4 %);
- антиаллергические препараты — 16 % (3-5 %);
- противомикробные препараты — 13 % (13 %);
- препараты для лечения синдрома «сухого глаза» — 9 % (4-6 %);
- противовоспалительные препараты — 9 % (1-3 %);
- комбинированные препараты — 7 % (0-2 %).

Ведущее место на рынке офтальмологических препаратов занимают препараты для местного применения в форме глазных капель (глазных растворов, суспензий и эмульсий). Глазные кап-

ли являются стандартной системой доставки лекарств уже в течение столетия. В настоящее время на их долю приходится около 95 % мировых продаж офтальмологических препаратов, что и послужило основанием для их дальнейшего исследования [1].

Мировой рынок офтальмологических лекарственных средств (ЛС), как и всей фармацевтической продукции, сосредоточен, в основном, в США, странах Европы и Японии. Для этих стран характерны общие демографические тенденции, проявляющиеся, прежде всего, в старении населения, росте загрязненности окружающей среды и распространении применения контактных линз и персональных компьютеров, что обуславливает высокую потребность в лекарственных препаратах для офтальмологии, повышение интенсивности исследований и разработок в области офтальмологических лекарственных средств и адекватный рост производства офтальмологических препаратов [2, 5].

Целью данной работы являются исследования состояния и перспектив развития рынка глазных капель на примере деятельности ведущих зарубежных фармацевтических компаний для выбора приоритетных для Украины направлений создания и производства инновационных офтальмологических препаратов в форме глазных капель.

Результаты анализа рынков офтальмологических препаратов Украины и стран ближнего зарубежья будут представлены в последующих наших сообщениях.

Методы исследования

Для проведения исследований рынка глазных капель в качестве объектов были выбраны ведущие инновационные офтальмологические

фирмы-производители США и Японии, которые занимают лидирующее положение на мировом рынке данной группы лекарств. На основе конъюнктурного, документального логического, экономико-статистического анализа, методов маркетинговых исследований (исследование товарной и фирменной структуры рынка) были исследованы основные тенденции развития рынка офтальмологических препаратов и создания новых ЛС.

Результаты исследований и их обсуждение

Рынки офтальмологических препаратов США, Японии и европейских стран подразделяются на товарные сегменты, к которым относятся офтальмологические препараты основных фармакотерапевтических групп: противоглаукомные, противовоспалительные, противомикробные (антибактериальные и противовирусные), антиаллергические, мидриатические ЛС, средства для терапии заболеваний сетчатки (в том числе синдрома «сухого глаза»), средства для лечения катаракты, препараты других фармакотерапевтических групп [8-10].

В Табл. 1 приведены результаты проведенного нами анализа основного ассортимента офтальмологических средств в форме глазных капель, представленного на европейском рынке (на примере Германии, Швейцарии, Великобритании) и рынке США по основным фармакотерапевтическим группам [8-9]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в ведущих странах мира для терапии офтальмологических заболеваний используются ЛС всех представленных в Табл. 1 фармакотерапевтических групп. Ассортимент активных субстанций, используемых в составе глазных капель, представленных на исследуемых рынках, является практически сопоставимым. Это связано с тем, что ведущие инновационные компании

и компании-производители свою продукцию позиционируют во всех регионах мира. Наиболее широким ассортиментом активных субстанций, характеризуются следующие сегменты рынка офтальмологических препаратов: противоглаукомные, противовоспалительные, антиаллергические, противомикробные средства, препараты для терапии сухого глаза.

Ведущими производителями офтальмологических препаратов в форме глазных капель в США являются: Alcon Eye Care, Inc., отделение корпорации Alcon Laboratories, Inc., Allergan Pharmaceuticals, Inc., Astra USA, Inc., Bausch & Lomb Pharmaceutical Division, Boots Co., Ltd., Ciba Vision Corp. (Novartis, Inc.), Merck & Co, Inc., Otcuka Pharmaceutical Co., Ltd., Parke-Davis Group, Division Of Warner-Lambert, Pfizer, Inc., Pharmacia&Upjohn, Rhone Poulenc Rorer, Santen Pharmaceuticals, USA (отделение концерна Santen, Япония).

Развитие мирового рынка глазных капель в последние годы можно проиллюстрировать на примере компаний-лидеров по ассортименту препаратов и динамике объемов продаж на мировом и внутренних рынках - Alcon Laboratories, Inc. и Allergan Pharmaceuticals, Inc. (США). Так, компания Alcon, являющаяся ведущей компанией мира по производству продукции для офтальмологии и работающая в этой отрасли более 50 лет, продает свою продукцию в 180 странах мира. Мировые продажи продукции Alcon в настоящее время составляют 17 % рынка офтальмологических препаратов. Компания занимает лидирующее положение в США на рынке препаратов для лечения глаукомы. Значительное место занимают препараты компании в форме глазных капель и на рынке противовоспалительных и противомикробных ЛС. Об этом свидетельствуют и данные о ведущих препаратах компании Alcon в форме глаз-

Таблица 1

Анализ субстанций, получивших коммерческую реализацию в форме глазных капель на рынках ведущих стран мира

Фармакотерапевтическая группа	Количество международных непатентованных наименований (МНН)				
	Германия	Швейцария	Великобритания	США	всего МНН в 4-х странах
противоглаукомные средства	26	18	14	20	34
антиаллергические средства	15	14	12	16	21
противомикробные средства	12	15	11	10	18
противовоспалительные средства	21	19	17	18	31
антикатарактальные средства	4	4	3	3	7
мидриатические и циклоплегические средства	6	6	5	7	9
препараты для терапии «сухого глаза»	9	7	8	21	28

Таблица 2

Ведущие препараты в форме глазных капель компании Alcon, представленные на мировом рынке

Торговое название	МНН	Форма выпуска
<i>антикатарактальные препараты</i>		
Quinax	Azapentazene	глазные капли, 0,015 %
Clarvisor	Pirenoxine	глазные капли (растворитель + таблетка)
<i>противоглаукомные препараты</i>		
Travatan	Travoprost	глазные капли, 0,004 %
Betoptic Betoptic S	Betaxolol HCl	глазные капли, 0,5 % глазная суспензия, 0,25 %
Azopt	Brinzolamide	глазная суспензия, 2 %
Timolol GFS	Timolol maleate	глазные капли
Iopidine 0.5%	Apraclonidine HCl	глазные капли, 0,5 %, 1 %
Betaxon	Levobetaxolol HCl	глазная суспензия, 0,5 %
Miostat	Carbachol	глазные капли, 0,01 %
Carteolol HCl	Carteolol hydrochloride	глазные капли, 1 %
<i>антиаллергические препараты</i>		
Patanol	Olopatadine HCl	глазные капли, 0,1 %
Emadine	Emedastine difumarate	глазные капли, 0,05 %
Cromolyn sodium	Cromoglicie acid	глазные капли, 4 %
Alomide	Lodoxamide trometamine	глазные капли, 0,1 %
<i>антибиотики, сульфаниламины</i>		
Tobrex	Tobramycin	глазные капли, 0,3 %
Vigamox	Moxifloxacin HCl	глазные капли, 0,5 %
Ciloxan	Ciprofloxacin HCl	глазные капли, 0,3 %
<i>противовирусные препараты</i>		
Trifluridine	Trifluridine	глазные капли, 1 %
Dendrid	Idoxuridine	глазные капли, 0,1 %
<i>противовоспалительные препараты</i>		
Profenal	Suprofen	глазные капли, 1 %
Maxidex	Dexamethasone	глазная суспензия, 0,1 %
Vexol	Rimexolon	глазная суспензия, 1 %
Econopred®	Prednisolone acetate	глазная суспензия, 0,125 %
Econopred®plus	Prednisolone acetate	глазная суспензия, 1 %
Flarex®	Fluorometholone Acetate	глазная суспензия, 0,1 %
<i>комбинированные противовоспалительные препараты</i>		
Maxitrol	Dexamethasone, neomycin sulfate, polymyxin B sulfate	глазная суспензия
Tobradex	Tobramycin, dexamethasone	глазная суспензия
Tobrasone	Fluorometholone acetate, tobramycin	глазная суспензия
Maxidex	Neomycin, polymixin-B sulfate, hydrocortisone	глазная суспензия
Isopto-Cetapred	Prednisolone acetate, sulfacetamide	глазная суспензия
<i>мигриатические препараты</i>		
Mydriacyl	Tropicamide	глазные капли, 0,5 %; 1 %
Cyclogyl	Cyclopentolate hydrochloride	глазные капли, 0,5 %; 1 %; 2 %
Cyclomydril	Cyclopentolate hydrochloride, phenylephrine	глазные капли, 0,2 %; 1 %
Paremyd	Hydroxyamfetamin hydrobromide, tropicamide	глазные капли
Isopto Номатропине	Номатропине	глазные капли, 2 %
Mydfrin	Phenylephrine	глазные капли, 2,5 %
Isopto Hyoscin	Scopolamine hydrochloride	глазные капли, 0,25 %
<i>препараты для применения при синдроме «сухого глаза»</i>		
Isopto®Tears	Hydroxypropylmethylcellulose	глазные капли, 0,5 %

Таблица 2 (продолжение)

Торговое название	МНН	Форма выпуска
Tears Naturale	Hypromellose, dextran	глазные капли
Tears Naturale Forte Lubricant Eye Drops	Dextran 70, glicerin, hydroxypropylmethylcellulose	глазные капли

ных капель и глазных суспензий, представленные на мировом рынке (Табл. 2) [8, 11-15].

Из Табл. 2 видно, что компания Alcon работает на всех сегментах рынка офтальмологических препаратов. Основной ассортимент, представленный в Табл. 2, исходя из международных непатентованных наименований (МНН) с учетом комбинированных препаратов, превышает 40 позиций. В основу стратегического развития компании положена инновационная деятельность, направленная на создание препаратов-брендов. Практически все группы препаратов, наряду с традиционными, представлены препаратами-брендами, которые входят в число лидеров по количеству выписываемых рецептов или являются инновационными разработками, интенсивно продвигаемыми на рынок.

Компания Allergan Pharmaceuticals, Inc. занимается разработкой, производством и продажей широкого ряда рецептурных препаратов для лечения таких угрожающих зрению состояний, как глаукома, воспалительные, инфекционные и аллергические заболевания, а также ряда безрецептурных препаратов, таких как «искусственные слезы».

Рынок противоглаукомных препаратов компании занимает 16 % мирового рынка ЛС для лечения глаукомы и является самым большим сегментом рынка рецептурных офтальмологических препаратов компании Allergan — 12 %. Лидером по объему продаж среди препаратов альфа-агонистов в течение нескольких лет является глазной раствор *Alphagan® (brimonidine tartrate)*, зарегистрированный FDA в 1996 году для лечения открытоугольной глаукомы и глазной гипертензии. Этот препарат является наиболее перспективным среди симпатомиметиков (агонистов альфа-2 адренорецепторов). Его селективность более чем в 30 раз превышает селективность препаратов данной группы — клонидина и апраклонидина [16, 17]. В 1998 году компания заключила соглашение с компанией Santen Pharmaceutical Co., Ltd. (Япония), предоставив ей эксклюзивные права на распределение препаратов бримонидина в Японии. По условиям этого соглашения Santen приняла на себя обязанности по разработке и продвижению препаратов бримонидина в будущем и получению лицензии на его продажу в Министерстве

здравоохранения Японии. Компания Allergan сохранила за собой права на совместное продвижение и продажу препаратов бримонидина в Японии. В конце 1999 года *Alphagan®* был зарегистрирован уже более чем в 50 странах мира и в настоящее время является лидером по объемам продаж среди других препаратов этой группы, выпускаемых компанией (Propin Dipivefrin, Epifrin Epinephrin).

Другим препаратом компании для лечения глаукомы является местный бета-блокатор *Betagan® (levobunolol)*. Этот препарат характеризуется положительной динамикой роста и занимает третье место по объемам продаж в целом по группе противоглаукомных средств [4, 16-18].

К группе аналогов простагландинов, которая является лидирующей на рынке противоглаукомных препаратов, относится и новая разработка компании - препарат *Lumigan (bimatoprost)*, глазной раствор 0.03 % [19].

Allergan является одной из ведущих компаний на сегменте рынка противоаллергических средств, применяемых в офтальмологии. Этой компании принадлежит патентованный глазной раствор *Opticrom (cromoglicie acid)*, который был зарегистрирован в США еще в 80-х годах прошлого века и получил широкое распространение для лечения аллергических заболеваний во всем мире.

В 1999 году FDA США предоставило компании Allergan лицензию на продажу глазного раствора 2 % *Alocril™ (nedocromil)*, предназначенного для ослабления симптомов аллергии, в частности, зуда, вызванного аллергическим конъюнктивитом. В феврале 2000 года компания заключила соглашение с фирмой Dura Pharmaceuticals (США) о совместном продвижении препарата на рынок. *Alocril™* в настоящее время является ведущим по объемам продаж препаратом компании Allergan. Доля препарата на рынке США составляет 7 % [20-22].

Новой разработкой компании Allergan в области антигистаминных препаратов для применения в офтальмологии в качестве средства для снятия симптомов аллергического конъюнктивита является *Relestat (epinastine)*. По условиям соглашения компания Boehringer Ingelheim предоставила компании Allergan права на раз-

работку и коммерческую реализацию офтальмологического раствора на основе epinastine. Компания Allergan получила права на продажу препарата во всех странах мира, за исключением Японии. Данный препарат зарегистрирован в странах ЕС в 2003 году.

Компания является также производителем и поставщиком на рынок ряда ведущих препаратов для лечения воспалительных и инфекционных заболеваний глаз. Лидирующее положение на рынке противовоспалительных кортикостероидов занимают офтальмологические суспензии *Pred Forte®* (prednisolone) и *FML®Liquifilm* (fluorometholone). Компания осуществляет также рыночные операции с офтальмологическим раствором *Acular®* (*ketorolac*), оказывающим противовоспалительное действие, в частности, при аллергии (аллергическом конъюнктивите), а также используемым для лечения воспалений после операций по экстракции катаракты. В 1997 году компания Allergan получила лицензию FDA на продажу препарата *Acular® PF*, первого однократного, не содержащего консервантов местного нестероидного противовоспалительного средства в США, предназначенного для ослабления боли в глазах и светобоязни после рефракционной хирургии [23].

Ассортимент компании также широко представлен комбинированными ЛС на основе кортикостероидов и антибиотиков: *FML-NEO*, *NEO-Hydro*, *Poly-Pred*, *Effumycin*, *Inflanegent*.

Основными препаратами компании Allergan на рынке противомикробных препаратов являются: глазные растворы для лечения бактериального конъюнктивита *Ocuflox®*, *Oflax®*, *Exocin®* (офлоксацин), *Zumar* (gatifloxacin); глазная суспензия *Blephamide®* - композиция противовоспалительного и противомикробного средств и глазной раствор *Polytrim®* (Polymixin-B Sulfate + Trimethoprim) - антибактериальное средство для лечения поверхностных инфекций глаз [17].

Компания является лидером на мировом рынке офтальмологических препаратов, относящихся к группе «искусственная слеза», за исключением Японии. Одной из последних разработок компании, выпущенных на рынок, является препарат *Restasis™* - глазная эмульсия для лечения хронического состояния «сухого глаза». В результате сотрудничества компании Allergan с другими фирмами и институтами также разработан ряд препаратов «искусственная слеза»: *Androgen Tear*, *ISN 365* (diquafosol), *Refresh Endura*.

Компания также проводит свои исследования в направлении разработки модифицирован-

ных версий хорошо зарекомендовавших себя препаратов (на рынок выведены *Alphagan P* и *Acular LS*) и создания новых эффективных комбинаций (*brimanidin + timolol*, *bimatoprost + timolol*).

Следует отметить также ряд компаний США, разрабатывающих новые направления в создании офтальмологических препаратов в форме глазных капель. К ним относятся, в частности, компания *Insite Vision Inc.*, занимающаяся разработкой офтальмологических лекарственных препаратов на генетической основе. Компанией создан ряд препаратов серии *ISV*, основанных на оригинальной патентованной технологии доставки глазных капель - *DuraSite eye drop-based drug delivery technology*, обеспечивающей замедленное высвобождение активного ингредиента. Система *DuraSite* представляет собой носитель для глазных капель на полимерной основе, пролонгирующий длительность пребывания препарата в глазу, что позволяет снизить частоту приема препарата. Эта система доставки может быть использована в составе широкого ряда препаратов, например, противоглаукомного, антикатарактального, противовоспалительного, антимикробного, антиаллергического действия, в препаратах искусственной слезы и др. Благодаря эффекту *DuraSite* в рецептуре, можно существенно снизить частоту приема препарата по сравнению с препаратами сравнения.

Первым препаратом, выпущенным на рынок, в котором была реализована технология *DuraSite*, был препарат для терапии сухого глаза *AquaSite*. Производство и распределение данного препарата осуществляется рядом компаний (*Ciba Vision*, *Global Damon Pharmaceuticals*, *SSP Co. Ltd.*) на основе лицензионного соглашения, заключенного фирмой-патентодержателем *Insite Vision Inc.* Данная фирма специализируется на разработке препаратов на основе технологии *DuraSite* с последующим предоставлением лицензий на промышленный выпуск и маркетинг другим фармацевтическим компаниям. Так, в 2002 году *Insite Vision* и *Bausch & Lomb* заключили лицензионное соглашение о совместной разработке антибактериального препарата. По условиям соглашения компания *Insite Vision* отвечает за клиническую разработку препарата для подачи заявки на регистрацию по процедуре заявки на новое ЛС (*New Drug Application* — *NDA*). Компания *Bausch & Lomb* несет ответственность за последующий промышленный выпуск и распределение [7].

Развитие рынка офтальмологических препаратов Японии можно проиллюстрировать на примере продукции компании *Santen Pharmaceutical*

Co, Ltd (далее — Santen), являющейся ведущей компанией по производству продукции для офтальмологии на японском и мировом рынках. Продажи глазных капель составляют более 80 % продаж фармацевтической продукции компании. Компания Santen первой в Японии начала выпуск глазных капель в полимерной упаковке. Компания экспортирует свою продукцию в различные регионы мира — Европу, Северную Америку, Юго-Восточную Азию и имеет в этих регионах широкий ряд дочерних фирм и отделений, занимающихся разработкой, производством и поставкой офтальмологических препаратов. Исследования и разработки компании офтальмологических препаратов в форме глазных капель сосредоточены, в основном, на четырех ведущих сегментах рынка Японии по группам препаратов, предназначенных для лечения аллергии, инфекций, «сухого глаза» и глаукомы [24-26].

Крупнейшим зарубежным рынком препаратов компании Santen является рынок США. Компания начала прямые продажи рецептурных препаратов на рынке США в 2000 году. Положение препаратов компании Santen на внутреннем рынке и рынке США иллюстрируется данными Табл. 3.

Таким образом, товарный портфель компании представлен препаратами, которые позиционируют себя на наиболее крупных сегментах рынка офтальмологических ЛС.

Европа является вторым крупнейшим рынком офтальмологических препаратов мира после США. Продажи продукции Santen сосредоточены на офтальмологических рынках Северной и Восточной Европы, включая все северные и балтийские страны и Россию. В перспективе компания планирует вывести продукцию на западно-европейские рынки. Продукция компании Santen продается также в 10 странах Азии [25].

Стратегические решения развития компании Santen основаны на проведении инновационной политики по созданию и выведению на рынок новых офтальмологических препаратов. Товарный портфель компании формируется как на основе собственных разработок оригинальных препаратов, так и на основе приобретения лицензий на производство и распределение ведущих препаратов-брендов, ставших лидерами по объемам продаж.

С целью расширения рынка своих препаратов компания Santen заключает стратегические союзы с ведущими фармацевтическими компаниями и исследовательскими организациями всего мира. Основные соглашения компании Santen по разработке офтальмологических препаратов в форме глазных капель направлены на разработку комбинированного противомикробного средства совместно с компанией Daiichi Pharmaceutical), препарата для лечения

Таблица 3

Ведущие рецептурные препараты компании Santen в форме глазных растворов, представленные на рынках Японии и США

Терапевтическая категория	МНН	Торговое название	Регион	Дата выпуска на рынок
бактериальный конъюнктивит	Levofloxaci	Cravit*	Япония	04.2000
		Quixin	США	11.2000
	Ofloxacin	Tarivid	Япония	09.1987
воспалительные заболевания	Fluorometholon	Flumetholon	Япония	10.1975
глаукома	Timolol	Betimol	США	01.2001
	Timolol maleate	Timoptol	Япония	09.1981
	Dipivefrin HCl	Pivalephrine	Япония	12.1988
	Bunazocine HCl	Detantol*	Япония	09.2001
аллергия	Levocabastine HCl	Livostin	Япония	01.2001
	Pemirolast potassium	Alegysal	Япония	04.1995
		Alamast*	США	07.2000
Ketotifen fumarate	Zaditen	Япония	07.1991	
заболевания роговицы («сухой глаз»)	Sodium hyaluronate	Hyalein	Япония	06.1995
старческая катаракта на ранней стадии	Pirenoxine	Kary Uni	Япония	07.1992

Примечание.

* — производство препаратов *Cravit*, *Detantol*, *Alamast* осуществляется компанией Santen в соответствии с лицензией, предоставленной компаниями-разработчиками: DAIICHI, EISAI, MITSUBISHI TOKYO PHARMACEUTICAL, соответственно.

глаукомы на основе производного простагландинов (с компанией Asahi Glass), ряда препаратов для лечения синдрома «сухого глаза» (с компаниями США Inspire Pharmaceuticals Inc. и Agennix Inc.), обезболивающего средства (с компанией США Adolor Corp.) и др. [24-26].

Выводы

Мировой офтальмологический рынок характеризуется положительной динамикой роста, что обусловлено различными факторами демографического, экономического, научно-технического и др. характера. Это способствует повышению интенсивности исследований и разработок в области офтальмологических ЛС, ускорению процедур регистрации и выведения на рынок новых препаратов, росту их производства и потребления.

В развитых зарубежных странах для терапии глазных заболеваний применяются офтальмологические препараты основных фармако-терапевтических групп: противоглаукомные, противовоспалительные, противомикробные, антиаллергические, мидриатические, средства для терапии заболеваний сетчатки (в том числе синдрома «сухого глаза»), средства для лечения катаракты. Ассортимент активных субстанций, используемых в составе глазных капель, является, практически, идентичным. Это связано с тем, что ведущие фармацевтические инновационные компании и компании производители свою продукцию позиционируют в большинстве регионов мира.

Стратегическое развитие ведущих компаний основано на проведении инновационной политики по их созданию новых эффективных офтальмологических препаратов. Товарный портфель этих компаний формируется преимущественно, на основе собственных и совместных с ведущими фармацевтическими фирмами и исследовательскими организациями всего мира разработок оригинальных препаратов, а также приобретения лицензий на производство и распределение лидирующих по объемам продаж препаратов – брендов. Товарный ассортимент ведущих компаний представлен перспективными инновационными препаратами для офтальмологии, а также хорошо зарекомендовавшими себя генериками основных фармако-терапевтических групп.

Перспективными направлениями в создании офтальмологических препаратов остаются разработки глазных капель-брендов всех основных групп офтальмологических ЛС, лидером среди которых в настоящее время является разработка глазных капель пролонгированного действия.

Это направление представлено препаратами на основе оригинальных технологий доставки глазных капель, обеспечивающей замедленное высвобождение активного ингредиента, что позволяет снизить частоту приема препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Півень О.П. Маркетингові дослідження світових тенденцій та аналіз патентно-ліцензійної ситуації в галузі створення нових протиглаукомних очних крапель // Вісник фармації. - 2008. - № 3. - С. 44-49.
2. Eye Pharmaceuticals & Disease Treatments: Back-of-the-Eye Therapies Driving Double-Digit Category Growth // OptiStock Market Watch. - London: Access Media Group, 2003. - 123 p.
3. FDA Issues Approvable Letter For Istalol (Timolol), Treatment For Glaucoma // Doctor's Guide. Personal ed. - New York: Doctor's Guide Publishing Ltd., 2003. - P. 298.
4. Glaucoma in 21st Century. - New York: Dain Rauscher Wesels, 2001. - 28 p.
5. Melissa Anne Elder. U.S. Market for Prescription Ophthalmic Drugs. - New York, 2000. - № 37. - 188 p.
6. New possibilities for the medical treatment of glaucoma // Glaucoma World. - 1998. - № 13. - P. 1-7.
7. Bausch & Lomb Financial Report. - Bausch & Lomb Co., 2002. - 82 p.
8. Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations. - Washington: US FDA, CDER, 2002. - 680 p.
9. Rote List. Herausgeber. Frankfurt/Main: Service GmbH, 2006. - 1535 p.
10. Japanese Companies in the US // Japan-US Business Report. - 2002. - 189 p.
11. Alcon Report for IV Quarter and Full Year 2002 Results. - Hunenberg, Switzerland, 2003. - 10 p.
12. Alcon Reports Strong Second Quarter and Six Month 2003 Results // News Release - HUNENBERG, Switzerland, 2003. - 30 p.
13. Travatan (travoprost) eye drops approved in EC for glaucoma // SCRIP. - 2002. - 01. - 2 p.
14. Vigamox (Moxifloxacin) ophthalmic Solution. - 2002. - NDA 21-598. - P. 8
15. Patanol (Olopatadine). Prescribing Information. - Alcon Pharmaceuticals, Inc, 2000. - 8 p.
16. Generic brimonidine // Review of Ophthalmology. - 2003. - Vol.10, № 8. - P. 1-6.
17. Management's discussion and analysis of financial condition and results of operations for the quarter ended june 27, 2003 // Allergan Quarterly Report. - 2003. - Item 2. - 27 p.
18. Fiscella R.G. Glaucoma Medications: A Drug Therapy Review // P&T DIGEST. - 2003. - № 8. - P. 25-51.
19. Lumigan (Bimatoprost ophthalmic Solution, 0.03 %). Package Insert. - Allergan Inc., 2002. - 3 p.
20. Allergan 2002 Annual Report. - Allergan, Inc. 2002. - 34 p.
21. Allergan 2003 Interim Report. - Allergan, Inc. 2003. - 13 p.
22. Alocril (nedocromil sodium ophthalmic solution) // Prescribing Information. - 2002. - February. - 7 p.
23. Allergan Announces FDA Approval of Acular LS Ophthalmic Solution; The New Formulation of the Prescribed Ophthalmic NSAID in the United States // Business Wire. - 2003. - 28 p.
24. Japanese Companies in the US // Japan-US Business Report. - 2002. - 189 p.
25. Santen Annual Report. - 2002. - 27 p.
26. Santen Pharmaceutical Co., Ltd. Financial Performance and Outlook. - Interim Period Ended September, 2002. - November 7, 2002. - 24 p.
27. Quixin (Levofloxacin) Anti-Infective Ophthalmic Solution To Be Available In US // Doctor's Guide. - 2000, October, 23. - P. 13-15.

Резюме

Півень О.П., Андрюкова Л.М.

Сучасний стан і перспективи розвитку ринку офтальмологічних препаратів на прикладі діяльності провідних зарубіжних фармацевтичних компаній

Досліджено світові тенденції в області створення і виробництва офтальмологічних препаратів на прикладі діяльності провідних зарубіжних фармацевтичних компаній. Проведено аналіз товарної структури ринку очних крапель. Встановлено основні принципи формування товарного асортименту провідних офтальмологічних компаній. Визначено перспективні напрямки створення нових офтальмологічних препаратів у формі очних крапель.

Summary

Piven O.P., Andryukova L.N.

Modern state and prospect of the development of the market of ophthalmologic preparations by the example of the activity of leading foreign pharmaceutical companies

World tendencies in the field of the development and manufacturing of ophthalmologic preparations by the example of

the activity of leading foreign pharmaceutical companies were studied. An analysis of commodity composition of the market of eye drops was conducted. Basic foundations of the forming of commodity range of leading ophthalmologic companies were established. Prospective directions of the development of new ophthalmologic preparations in the form of eye drops were determined.

Півень Елена Петровна. Д.фарм.н. Доцент кафедри менеджмента и маркетинга в фармации Национального фармацевтического университета.

Андрюкова Лариса Николаевна. Окончила Харьковский политехнический институт (1982), Национальный аэрокосмический университет «ХАИ» (2002). К.фарм.н. (1994). Зав. лабораторией глазных, ушных и назальных лекарственных форм ГП ГНЦАС (1996). Ст. науч. сотр. (2000). Член Редакционного совета Государственной Фармакопеи Украины.

УДК 615.12:339.138

Пестун І.В., Мнушко З.М.

Національний фармацевтичний університет

Тенденції та особливості рівневого маркетингового управління на фармацевтичному ринку

Наведено загальне обґрунтування сучасного маркетингового управління на державному, регіональному рівнях та на рівні підприємства: макро-, мезо- та мікрорекетування. Визначено галузеві особливості та перспективи розвитку рівневого маркетингового управління. Виділено його актуальні напрямки у діяльності фармацевтичних виробничих, оптово-посередницьких підприємств і аптек.

Використання маркетингу в управлінні суб'єктами господарювання в умовах конкурентного ринку навіть при стабільному зовнішньому середовищі є беззаперечним, а у періоди загострення фінансово-економічної ситуації та кризових явищ роль маркетингу суттєво зростає. Маркетингове управління фармацевтичними й аптечними підприємствами спрямоване, перш за все, на пошук виходу із кризи та шляхів найбільш ефективного використання обмежених ресурсів. При цьому, у зв'язку з орієнтацією корпоративної стратегії на ринок, переваги фармацевтичного підприємства досягаються не тільки за рахунок внутрішнього маркетингу, а і внаслідок розвитку маркетингової діяльності, що має відношення до всіх ключових суб'єктів ринку. Відповідно, маркетингова функція управління не концентрується тільки у відділі (службі) маркетингу, а реалізується через систему міжфункціональних зв'язків практично всіх структурних підрозділів підприємства.

Незважаючи на досить широкий спектр наукових досліджень за складовими маркетингу, сучасні підходи до маркетингового управління

суб'єктами господарювання на фармацевтичному ринку висвітлені фрагментарно в окремих публікаціях [9, 10, 13, 15].

Метою даної роботи є визначення теоретичних і прикладних засад розвитку стратегічного й оперативного маркетингового управління суб'єктами господарювання на фармацевтичному ринку.

В якості методів дослідження використано моніторинг наукових публікацій, системний та логічний аналіз, описове моделювання.

Традиційний процес управління маркетингом, що використовувався підприємствами до кінця минулого століття, передбачав реалізацію алгоритму, в основу якого покладено складові: вивчення потреб - вибір потенційних ринків і споживачів - функціональні особливості та конкурентні переваги товару - сегментування ринку та позиціонування товару - відбір цільових груп споживачів - збільшення обсягів продажу, ринкової частки, прибутку. Проте, виконання планових показників продажу та прибутку не завжди забезпечує зміцнення фінансово-економічного стану підприємства. Зміни умов використання маркетингу зумов-

лені підвищенням вимогливості споживачів до якості фармацевтичного товару, надання послуг, до ціни та цінності лікарських препаратів. До того ж, використання конкурентами на фармацевтичному ринку одних і тих самих інструментів маркетингу знижує вірогідність отримання переваг, внаслідок чого керівництво фірм іде шляхом зменшення витрат, у тому числі й на маркетинг. Отже, формуються передумови до використання нових підходів.

Новий маркетинг орієнтований на збільшення вартості бізнесу, значну частину якого можуть становити нематеріальні активи (технологічні ресурси, знання та вміння персоналу, маркетингові активи — відомість бренда, взаємовідносини у каналах розподілу товару, лояльність клієнтів і споживачів тощо). Посилюється також орієнтація на довгострокову перспективу усіх напрямів маркетингової діяльності. Відповідно, закономірним стає удосконалення управлінських маркетингових концепцій, акцент на ключові фактори успіху фармацевтичного виробничого або оптово-роздрібного підприємства, концентрація зусиль на визначенні довгострокових цілей, пов'язаних із прийняттям стратегічних рішень.

У класичному розумінні процвітання суспільства є результатом маркетингового управління [2]. Виходячи з цього, доцільним є використання теорії та практики рівнево-галузевого маркетингового управління, іншими словами, опрацювання понять макро-, мезо-, та мікро-маркетингу, їх галузевих особливостей і сучасних тенденцій.

Маркетинг на рівні суспільства або макро-маркетинг зумовлений тим, що сьогодні маркетингова діяльність будь-якого підприємства, у тому числі фармацевтичного, вийшла за рамки окремого суб'єкта господарювання. Розширення маркетингового простору стає наслідком процесів інтеграції у сучасній економіці окремих ринків в єдине ціле, спрямування їх на задоволення потреб населення, зростання його добробуту у короткостроковій та довгостроковій перспективах [16]. У фармацевтичній галузі макро-маркетинг тісно пов'язаний із концепцією соціально-етичного маркетингу, головним принципом якої є поєднання інтересів споживачів, підприємств і суспільства. Соціальна орієнтація фармацевтичного ринку вимагає від маркетингового управління не стільки забезпечення успіху бізнесу, скільки адаптування діяльності з виробництва, збуту та просування фармацевтичної продукції до вимог ринку, потреб споживачів із метою досягнення соціального ефекту, зменшення як комерційних видів

ризиків, так і спеціальних, пов'язаних із загрозою здоров'ю населенню.

Цьому сприяють:

- дотримання законодавства у сфері розробки, виробництва, контролю якості та реалізації лікарських засобів;
- розвиток виробництва високоефективних і безпечних лікарських препаратів;
- забезпечення населення ліками належної якості у необхідному асортименті шляхом реалізації національної лікарської політики, відповідних загальнодержавних програм, пільгового фінансування, оптимальної цінової політики;
- створення умов забезпечення соціально-економічної, у тому числі маркетингової доступності лікарських засобів і виробів медичного призначення;
- формування та реалізація програм санітарно-профілактичної роботи з населенням, зокрема з питань відповідального самолікування, раціонального прийому ліків та ін.

У цілому макро-маркетинг має виступати в якості важливого інструмента при розробці та виконанні соціально-економічних, інвестиційних, зовнішньоекономічних, регіональних програм, спрямованих на формування національного фармацевтичного ринку та задоволення потреб споживачів ліків.

Значним і перспективним у макро-маркетингу на фармацевтичному ринку є використання індикаторів Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) в якості критеріїв оцінки системи забезпечення населення лікарськими засобами. Серед них такі маркетингові чинники, як структура, процеси, правова база та регулювання фармацевтичного ринку; процедури відбору та реєстрації ліків; фізичний розподіл ліків (дистрибуція), логістика; цінова політика; інформаційна робота з лікарями, провізорами (фармацевтами) та споживачами; підвищення кваліфікаційного рівня фахівців. Це також індикатори, що характеризують наявність і доступність основних лікарських засобів, якість ліків, їх раціональне використання [12].

Другим рівнем маркетингового управління на фармацевтичному ринку є територіально-галузевий або мезо-маркетинг. Використання мезо-маркетингу в цілому в територіальному управлінні спрямоване на забезпечення конкурентоспроможності та соціально-економічного розвитку певної адміністративно-територіальної одиниці (область, місто, район) або окремої галузі регіону. Регіональні органи влади в якості інструментів впливу можуть використовувати держзамовлення, лобіювання інтересів регіо-

ну в державних органах влади, адміністративне регулювання (яке, проте, має обмежений вплив на підприємців). Незважаючи на спільні цілі, територіально-галузевий маркетинг у різних регіонах має свої особливості, пов'язані зі співвідношенням секторів економічної діяльності та ступенем державного впливу на регіон, із характеристиками діючих підприємств (розмір, форми власності тощо), із середовищем, в якому здійснюється підприємницька діяльність, схильністю до інновацій та впровадження новітніх технологій тощо [1, 5].

Фармацевтичний мезомаркетинг має виражені регіональні особливості, обумовлені різним науковим, виробничим, торговельним і споживачьким потенціалом. Так, високим рівнем його можна вважати потенціал Харківської та Київської областей, дещо нижчим — Одеської, Львівської, Донецької, Луганської областей. Незважаючи на сучасну певну відокремленість суб'єктів господарювання різних сфер діяльності на регіональних фармацевтичних ринках, із урахуванням світових тенденцій до інтеграції, глобалізації та концентрації капіталу, можна прогнозувати для регіонів із високим ринковим потенціалом розвиток регіонального галузевого маркетингового управління. Природним є формування партнерських взаємовідносин, створення стратегічних довгострокових альянсів, горизонтальних і вертикальних маркетингових систем, формальних і неформальних господарських об'єднань.

Обґрунтування перспектив маркетингової стратегії у регіоні базується на аналізі ринкової ситуації та галузевих можливостей регіону, формуванні стратегії, її реалізації та контролю [4]. Для аналізу ринкової ситуації та можливостей фармації регіону доцільне використання SWOT-аналізу із виділенням сильних і слабких сторін за показниками: якість життя населення регіону (народжуваність, смертність, захворюваність, рівень медичного обслуговування, платоспроможність населення, його структура за рівнем доходів тощо), ринкова частка виробництва, реалізації фармацевтичного товару у регіоні, структура виробничих підприємств, оптових фармацевтичних фірм та аптек, асортимент лікарських засобів і виробів медичного призначення, рівень інновацій (впровадження нових лікарських препаратів, нових технологій), рівень сервісу тощо.

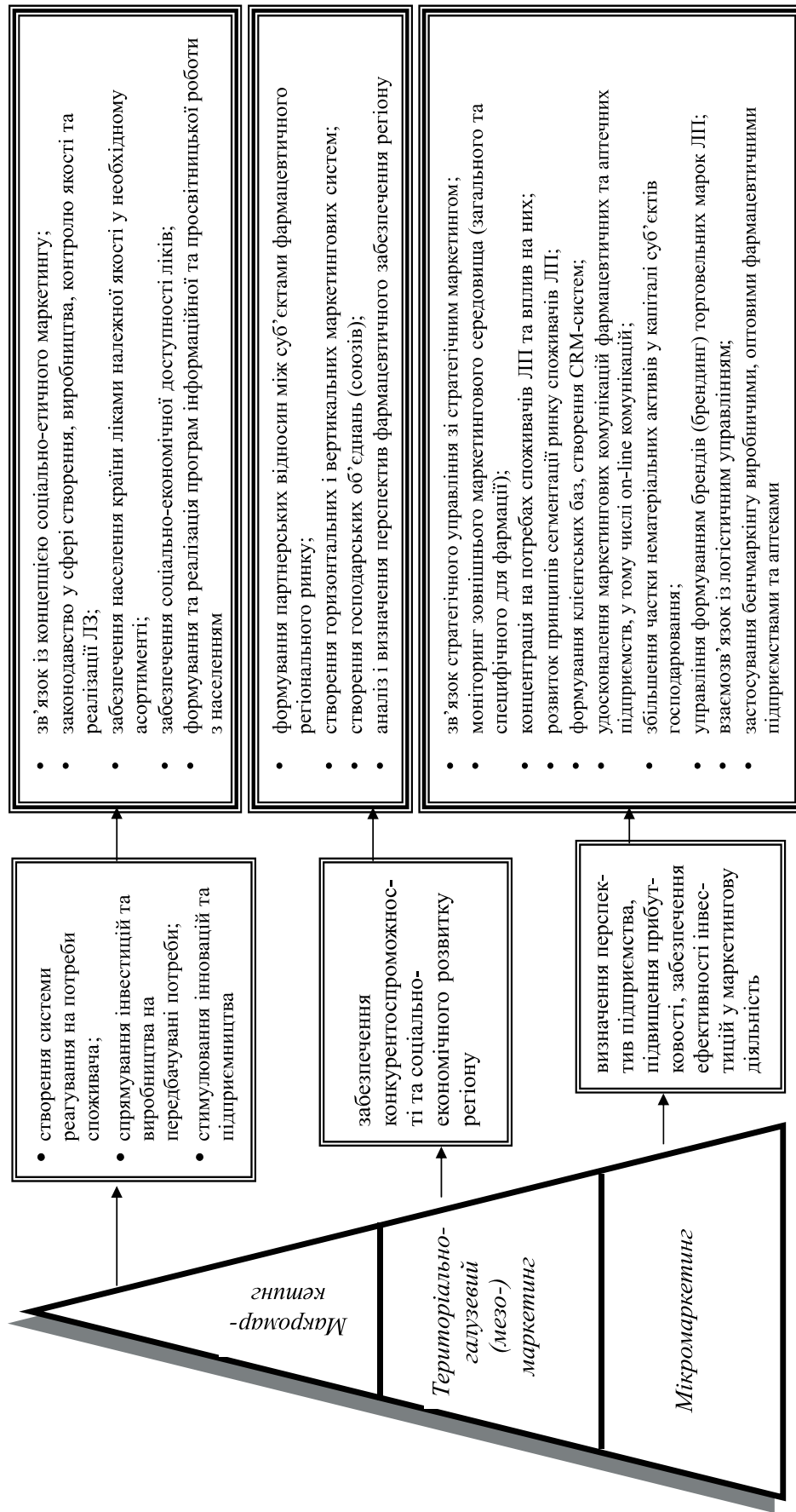
Аналізуються можливості розвитку регіонального фармацевтичного ринку та загрози, що стає підґрунтям для формування стратегії його розвитку. Перспективним вважається створення маркетингового регіонального центру (на-

приклад, для Харківської області це можливо при управлінні фармацією та фармацевтичною промисловістю) зі співучастю маркетингових структур наукових і навчальних закладів, співробітництвом із маркетинговими службами виробничих та оптово-роздрібних фармацевтичних підприємств. Окремі складові територіально-галузевих маркетингових управлінь, зокрема, моніторинг цін на лікарські засоби, роздрібний аудит уже впроваджено, проте управління передбачає реалізацію функцій стратегічного планування, координації, контролю й оцінки ефективності здійснюваних заходів.

Під впливом змін ринкового середовища відбуваються зміни пріоритетів маркетингу окремого підприємства, тобто мікромаркетингу. Розширюються масштаби маркетингової діяльності суб'єкта господарювання, переважають нові функції мікромаркетингу, посилюється його роль і вплив на управління всією діяльністю підприємства. Відбувається це на засадах взаємозв'язку менеджменту та маркетингу: менеджмент включає в себе маркетинг як підхід, спрямований на формування ринку покупця, а маркетинг використовує функції менеджменту. Маркетингове управління підприємством визначає його зовнішньо-внутрішню перспективу, в основі якої знаходиться стратегічне планування, визначення цільового ринку, акцентування уваги на потребах споживачів.

Головною метою сучасного маркетингового управління у сферах виробництва та реалізації фармацевтичного товару є підвищення прибутковості маркетингу, повернення та забезпечення ефективності інвестицій у маркетингову діяльність. Тільки за виконання такої умови маркетинг може посісти належні позиції в управлінні фармацевтичним підприємством і забезпечити йому ринкові переваги. Тому зростає важливість використання аналітичних методів роботи маркетологів, кількісної оцінки результатів маркетингових програм. Використання ROI-маркетингу (коефіцієнт окупності інвестицій на маркетинг) звичайно підвищує прибутковість на (15-30)% [14].

Досягнення необхідних результатів, як правило, є наслідком чіткої бізнес-стратегії підприємства, якісного стратегічного управління й обґрунтованого стратегічного маркетингу. Відповідно, посилюється значення постійного моніторингу змін зовнішнього маркетингового середовища, оцінки нових внутрішніх можливостей та ускладнень, використання таких методів стратегічного планування, як розробка сценаріїв, безперервне та ковзаюче планування [3, 8, 11, 13]. Зв'язок маркетингу зі стратегічним



Рисунок

Узагальнені характеристики та особливості рівневого маркетингового управління на фармацевтичному ринку

планування підприємства проявляється через: забезпечення орієнтації стратегії підприємства на потреби важливих груп споживачів; надання вихідних даних для розробників стратегічного плану; виявлення привабливих можливостей ринку; оцінку виробничо-збутового потенціалу підприємства; надання методичної та інформаційної допомоги у розробці стратегії виконання поточних завдань кожним структурним підрозділом підприємства [2]. Слід зазначити, що ефективним сучасним організаційним засобом опрацювання маркетингових програм вважається створення «центрів узгодження» за участі представників різних підрозділів організації, зацікавлених у реалізації проекту.

Поряд із використанням стратегічного маркетингу серед основних актуальних напрямків оперативного управління маркетингом фармацевтичних та аптечних підприємств слід виділити такі [6, 7, 9]:

- обґрунтоване планування маркетингу (цілі, позиціонування фармацевтичного товару та самого підприємства, тактичні дії) та його бюджету;
- вибір цільового сегмента ринку, концентрація на потреби споживачів, поєднання принципів їх задоволення та активного впливу на споживачів лікарських препаратів (особливо в умовах поширення відповідального самолікування);
- використання, поряд із загальноприйнятими критеріями сегментації споживачів (географічні, демографічні, за захворюваністю), поведінкових і психографічних критеріїв;
- створення CRM-систем (Customer Relationship Management — управління відносинами з клієнтами) для накопичення, аналізу та диференційованого підходу до роботи з окремими групами клієнтів (фармацевтичних підприємств із посередниками; оптових фармацевтичних підприємств з аптеками; аптек з індивідуальними споживачами);
- зміна акцентів у маркетинговій комунікативній діяльності фармацевтичних та аптечних підприємств, перехід від загальної рекламно-інформаційної діяльності до індивідуальних форм роботи із цільовими аудиторіями через медичних (фармацевтичних), торгових представників. В аптечних закладах — розвиток навичок індивідуальної роботи з клієнтами, підвищення рівня сервісу, надання консультативних і додаткових послуг;
- зростання ролі та частки нематеріальних активів у складі капіталу виробничих та оптовороздрібних підприємств;
- розвиток інтернет-маркетингу та он-лайн комунікацій;

- планування та здійснення брендингу;
- використання різних видів і методів логістики;
- застосування бенчмаркінгу суб'єктами фармацевтичного ринку з метою удосконалення систем менеджменту підприємств та підвищення їх конкурентоспроможності;
- впровадження в роботу фармацевтичних оптових підприємств та аптек технології трейд-маркетингу (торгового маркетингу). Основними його складовими є розвиток взаємовідносин із торговими посередниками та власним торговим персоналом, проведення заходів із підтримки й укріплення лояльності партнерів, збір і аналіз інформації від торгових представників; використання мерчандайзингу. Ефективному маркетингу оптовороздрібних фармацевтичних підприємств сприяє також категорійний менеджмент, що передбачає управління асортиментом за визначеними товарними категоріями з урахуванням частки товарообігу кожної категорії у загальному показнику, її інвестиційної привабливості та ролі у створенні конкурентних переваг торгового підприємства;
- використання сучасних методів і моделей визначення ефективності маркетингової діяльності суб'єкта господарювання.

Узагальнені характеристики та особливості макро-, мезо- та мікрорекламувального управління на фармацевтичному ринку наведено на Рисунку.

Висновки

Визначено сучасні тенденції маркетингової діяльності суб'єктів господарювання на фармацевтичному ринку.

Виділено й охарактеризовано рівні управління маркетингом: макрорекламування, територіально-галузевий (мезо-) маркетинг та мікрорекламування.

Описано особливості рівневого маркетингового управління фармацевтичної галузі.

Подальші дослідження спрямовані на опрацювання та адаптування до національної системи лікарського забезпечення маркетингових індикаторів ВООЗ, розвиток механізмів мезо-маркетингу й удосконалення маркетингового управління окремими суб'єктами господарювання на фармацевтичному ринку.

ЛІТЕРАТУРА

1. Визгалов Д.В. Маркетинг города: практики в поисках теории // Маркетинг в России и за рубежом. — 2008. — № 3 (65). — С. 78-82.
2. Гавриленко Н.И. Возрастание роли стратегического маркетинга в управлении хозяйствующими субъектами // Менеджмент в России и за рубежом. — 2008. — № 4. — С. 83-91.

3. Голубков Е.П. Теория и методология маркетинга: настоящее и будущее. - Дело и сервис, 2008. - 208 с.
4. Жариков Р.В. Развитие регионального рынка продовольственных товаров / Жариков Р.В., Жарилова М.В. // Маркетинг в России и за рубежом. - 2008. - № 3 (65). - С. 120-123.
5. Житкова Е.Л. Маркетинг города: перспективные направления совершенствования (на примере г.Тольятти) // Там же. - 2006. - № 5 (55). - С. 79-83.
6. Колосова М. Управление в согласии с развитием. Часть I. Определяем тенденции // Российские аптеки. - 2008. - № 3. - С. 20-25.
7. Маслов Д. Особенности применения бенчмаркинга на малых и средних предприятиях // Там же. - 2005. - № 10. - С. 16-19.
8. Мнушко З.М. Дослідження системи планування у фармацевтичних організаціях / Мнушко З.М., Сафіуліна З.Р., Пестун І.В., Тутутченко О.В. // Фармац. журн. - 2005. - № 4. - С. 29-32.
9. Мнушко З.М. Проблеми та напрями підвищення ефективності маркетингового управління фармацевтичними організаціями / З.М. Мнушко, І.В. Пестун // Ефективність використання маркетингу та логістики фармацевтичними організаціями: Матеріали наук.-практ. конф. (Харків, 21 жовтня 2008 р.). - Х.: Вид-во НФаУ, 2008. - С. 3-10.
10. Мнушко З.М. Система та методи контролю маркетингової діяльності фармацевтичних підприємств / Мнушко З.М., Дорохова Л.П., Пестун І.В., Ларіонова Н.В. // Фармаком. - 2006. - № 3. - С. 88-92.
11. Мнушко З.М. Стан та перспективи впливу макрооточення на діяльність фармацевтичних організацій в Україні / Мнушко З.М., Пестун І.В. // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. - 2008. - № 1. - С. 8-14.
12. Пестун І.В. Використання індикаторів ВООЗ в маркетингових дослідженнях національного ринку // Ефективність використання маркетингу та логістики фармацевтичними організаціями: Матеріали наук.-практ. конф. (Харків, 21 жовтня 2008 р.). - Х.: Вид-во НФаУ, 2008. - С. 48-49.
13. Пестун І.В. Маркетингове інформаційне забезпечення процесу прийняття управлінських рішень у фармації / Пестун І.В., Мнушко З.М., Преснякова В.В. // Фарм. журн. - 2007. - № 1. - С. 9-14.
14. Савич А. Маркетинг, управляемый результатами, - путь к прибыльности и росту // Фармацевт практик. - Июнь 2006. - С. 16-17.
15. Сафіуліна З.Р. Теоретичне обґрунтування застосування маркетингу як інтегрованої функції стратегічного управління / Сафіуліна З.Р., Мірошник М.В. // Ефективність використання маркетингу та логістики фармацевтичними організаціями: Матеріали наук.-практ. конф. (Харків, 21 жовтня 2008 р.). - Х.: Вид-во НФаУ, 2008. - С. 40-45.
16. Чухломина И.В. Современный маркетинг: к определению сущности и изменению его роли в экономике // Вестник Омского университета. - 1998. - Вып. 3. - С. 69-72.
17. Perreault William P. Essentials of Marketing: Global Managerial Approach / William P. Perreault, Jr. E. Jerome McCarthy. - 2000. - 8th ed. - 588 p.

Резюме

Пестун І.В., Мнушко З.Н.

Тенденции и особенности уровня маркетингового управления на фармацевтическом рынке

Приведено общее обоснование современного маркетингового управления на государственном, региональном уровнях и уровне предприятия: макро- мезо- и микромаркетинга. Определены отраслевые особенности и перспективы развития уровня маркетингового управления, выделены его актуальные направления в деятельности фармацевтических производственных, оптово-посреднических предприятий и аптек.

Summary

Pestun I.V., Mnushko Z.M.

Tendencies and characteristics of level marketing management in pharmaceutical market

The general substantiation of modern marketing management at the state, regional levels and at the level of the enterprise: macro-, middle- and micromarketing, was given. Branch-wise characteristics and prospects of the development of marketing management level were determined. Its actual directions in activity of pharmaceutical manufacturing, wholesale-intermediary enterprises and drugstores were defined.

Пестун Ирина Владимировна. Доцент кафедри менеджменту та маркетингу у фармації НФаУ. К.фарм.н. (2002).

Мнушко Зоя Миколаївна. Зав. кафедри менеджменту та маркетингу у фармації НФаУ. Професор. Д.фарм.н. (1990).

Аналітичний огляд

УДК 615.244

Литвинова Е.В.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств»

Фармакологическая регуляция баланса цитокинов при заболеваниях печени (обзор)

В обзоре обсуждается нарушение баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при патологии печени различной этиологии. Охарактеризованы препараты, регулирующие продукцию цитокинов при заболеваниях печени. Продемонстрирована перспективность разработки отечественных препаратов, влияющих на цитокин/эндотоксин опосредованное повреждение печени.

Заболевания печени и гепатобилиарной системы относят к числу широко распространенных патологий пищеварительной системы. В связи с неуклонным ростом частоты указанных заболеваний, вызванных, в основном, неблагоприятной экологической обстановкой, изменением иммунной реактивности организма, нерациональным питанием, широким распространением гепатогенных вирусов, актуальны вопросы оптимизации фармакотерапии болезней печени [1, 4, 18].

Исследования патогенеза различных по этиологии поражений печени показали общие механизмы развития патологического процесса, в котором сочетаются явления воспаления и усиления процессов перекисного окисления липидов, угнетение синтетической, желчевыделительной, желчеобразовательной функций, нарушение кооперативной функции иммунокомпетентных клеток и ослабление активности факторов неспецифической резистентности [13].

В настоящее время известна существенная роль иммунных механизмов в патогенезе большинства печеночных заболеваний, выявлено немаловажное значение цитокинов. Основные биологические функции цитокинов связаны с регуляцией развития и гомеостаза иммунной системы, контролем за ростом и дифференцировкой клеток и участием в неспецифических защитных реакциях организма. К системе цитокинов в настоящее время относят около 200 индивидуальных полипептидных веществ, для которых характерны плеiotропность и взаимозаменяемость биологического действия, отсутствие антигенной специфичности, проведение сигнала путем взаимодействия со специфическими клеточными рецепторами, формирование цитокиновой сети. У здоровых лиц содержание цитокинов минимально, они выявляются лишь в следовых количествах. При патологических состояниях общее число и содержание отдель-

ных цитокинов резко возрастает. Индукторами повышенного синтеза цитокинов являются инфекционные микроорганизмы (вирусы, бактерии), продукты их жизнедеятельности, токсины, метаболиты, а также измененные, модифицированные клетки собственного организма, некоторые белки растительного происхождения, пищевые, лекарственные аллергены и др. [6, 15, 24].

Цитокины активны в очень малых концентрациях. Их биологический эффект на клетки реализуется через взаимодействие со специфическим рецептором, локализованным на клеточной цитоплазматической мембране. Образование и секреция цитокинов происходит кратковременно и строго регулируется. Выделяют провоспалительные и противовоспалительные цитокины. Группу цитокинов с провоспалительным действием составляют интерлейкины (IL) - IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18; TNF- α (фактор некроза опухоли альфа), IFN- γ (интерферон-гамма). К цитокинам с противовоспалительными свойствами относятся IL-4, IL-10, IL-11, эндогенные антагонисты рецепторов IL-1, TGF- β (трансформирующий фактор роста бета) [3, 15, 24].

Патогенетическому механизму цитокин/эндотоксин опосредованного повреждения печени в последние годы уделяют все большее внимание. Рассмотрим изменения уровня цитокинов при различных патологиях печени.

Острый алкогольный гепатит

В последние десятилетия отмечается рост количества лиц, страдающих алкогольной болезнью печени, что связано с большим объемом потребления алкоголя. Согласно имеющимся на сегодняшний день данным в механизме развития оксидативного стресса при остром алкогольном гепатите условно выделяют три фазы [18].

Первая фаза

Этанол и ацетальдегид вызывают повреждение мембран клеток печени, гладкого эндоплазматического ретикулума и митохондрий, а также перераздражение цитохрома P450 E21, клеток Купфера. Повреждения сопровождаются выбросом провоспалительных цитокинов, прежде всего TNF1- β , а также IL-1. Наблюдается рост количества поступающего в печень эндотоксина и сопутствующих ему патогенных веществ.

Вторая фаза

Первичные медиаторы воспаления TNF1- β и IL-1 при продолжающемся поступлении токсических продуктов и перераздражении липоцитов активируют образование «вторичных» медиаторов воспаления — IL-6, IL-8, TGF (transforming growth factor — трансформирующий фактор роста), PDGF (platelet derived growth factor — тромбоцитарный фактор роста). IL-6 ведет к воспалительным изменениям в печени; IL-8 способствует развитию мультиорганной недостаточности; TGF активирует фиброгенез; PDGF также может активировать фиброгенез.

Третья фаза

Вторичные медиаторы воспаления, в частности IL-6 и IL-8, ведут к нарастанию содержания непосредственных продуцентов воспаления — O₂, NO₂, H₂O₂ и других пероксидов.

Согласно клиническим данным, цитокины при алкогольном поражении печени могут служить маркерами стадии заболевания. Так, у больных алкогольным гепатитом показано не только значительное повышение уровня TNF- α в сыворотке крови, но и его корреляция с тяжестью заболевания и смертностью. Одновременно с TNF- α возрастают и концентрации в крови индуцируемых им IL-1, IL-6, IL-8, которые также участвуют в развитии воспалительных изменений гепатоцитов, процессах апоптоза и фиброгенеза [17].

Неалкогольный стеатогепатит

Выделяют самостоятельную нозологическую форму хронических поражений печени, не связанную с употреблением этанола и названную стеатозом печени и неалкогольным стеатогепатитом.

Патогенез неалкогольного стеатогепатита объясняет теория «двух толчков», объединяющая известные факторы риска. При нарастании ожирения увеличивается поступление в печень свободных жирных кислот и развивается стеатоз печени — теория «первичного толчка». Во время этого процесса происходят реакции окис-

ления свободных жирных кислот и образуются продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) и реактивные формы кислорода — оксидативный стресс (теория «второго толчка»). Теория «второго толчка» обосновывает развитие стеатогепатита, в связи с чем имеет более важное клиническое и прогностическое значение. Свободные радикалы запускают реакции ПОЛ и секрецию цитокинов, включая TNF- α , IL-6 и IL-8. Эти патологические реакции приводят к некрозу гепатоцитов и развитию воспалительной клеточной инфильтрации. Продукты ПОЛ, некроз гепатоцитов, TNF- α , IL-6, IL-8 являются активаторами stellatных клеток Ито. Их стимуляция сопровождается избыточной продукцией соединительной ткани с развитием фиброза, а при длительном персистировании процесса — циррозом печени [5].

Указанная теория патогенеза неалкогольного стеатогепатита подтверждается данными клинических исследований. Так, изучено содержание про- и противовоспалительных цитокинов сыворотки крови у 40 больных неалкогольным стеатогепатитом. При этом установлено достоверное повышение концентрации TNF- α , IFN- γ у 26 (65 %) и у 33 (82 %) больных, соответственно, по сравнению с таковыми в контрольной группе. Содержание провоспалительных цитокинов имело достоверную связь с основными клинколабораторными показателями обследованных больных. Полученные результаты позволяют предположить нарушение баланса в продукции цитокинов в сторону провоспалительных и роли этих цитокинов в прогрессировании поражения печени при рассматриваемой патологии [11].

Вирусные гепатиты

В развитии и течении вирусных поражений печени также важная роль принадлежит цитокинам. IL-1 β — эндогенный биологически активный медиатор неспецифического действия, один из первых включается в ответную защитную реакцию при вирусной инфекции. IL-1 β активирует Т- и В-лимфоциты, усиливает их цитотоксические свойства, инициирует синтез IL-6, TNF- α и др. IL-6 по своим биологическим свойствам сходен с IL-1 β , продуцируется в основном лимфоцитами, однако в его синтезе могут принимать участие гепатоциты, клетки Купфера, эпителиальные клетки внутрипеченочных желчных протоков. IL-6 стимулирует воспалительные, иммунные, метаболические процессы, играет важную роль в пролиферации клеток. TNF- α регулирует интенсивность воспаления иммунного ответа, активирует Т- и

В-лимфоциты, естественные клетки-киллеры, оказывает гепатоксический эффект, принимает участие в апоптозе поврежденных клеток [10].

Определение цитокинового спектра при хронических заболеваниях печени вирусной этиологии также имеет прогностическое значение, так как позволяет судить об активности заболевания, его прогрессировании, а также об эффективности проводимой противовирусной и иммунокорректирующей терапии. Так, методом ферментного иммуноанализа определен уровень IL-1 β , IL-4, IL-6 и TNF- α в периферической крови 250 пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС), В (ХГВ), D (ХГD) and G (ХГG). Выявлено, что концентрация IL при хронических вирусных гепатитах зависит от этиологического фактора (ХГС, ХГВ, ХГD, ХГG), активности (высокая, средняя, низкая), стадии (хронический гепатит, цирроз) заболевания. Наблюдается высокий уровень IL при ХГС, средняя концентрация при ХГВ и минимальная при ХГG. Максимальный уровень IL наблюдался при высокой активности гепатита в стадии цирроза печени [10].

В других клинических исследованиях обследовано 124 больных на разных стадиях течения хронического гепатита С, у которых был исследован уровень IL-6 в сыворотке крови. У больных с прогрессированием фиброза печени выявлены высокие уровни IL-6 в сыворотке крови и ослабление экспрессии гена цитохрома P450 в гепатоцитах, прямо коррелирующее со степенью фиброза печени и темпом его прогрессирования. На основании многофакторного дискриминантного анализа установлено, что повышение IL-6 в сыворотке крови больных хроническим гепатитом С является независимым фактором прогрессирования фиброза печени наряду с возрастом пациента и поражением почек [9].

Проведен сравнительный анализ спонтанной и LPS-стимулированной продукции цитокинов, в культурах клеток крови здоровых доноров и больных хроническими вирусными гепатитами с наличием фиброза и цирроза печени. Показано, что трансформация в цирроз связана с усилением спонтанной продукции IL-4 и IL-13 и прогрессирующим возрастанием спонтанной продукции IFN- γ , TNF- α и IL-10. В свою очередь утяжеление цирроза ассоциируется с нарастанием выраженности воспалительной активности крови и снижении противовоспалительного потенциала [19].

В последнее время интенсивно стали проводиться исследования генетической компонен-

ты хронических вирусных гепатитов. Ведется активный поиск генов-кандидатов предрасположенности к вирусным гепатитам [2]. Предложена предсказательная модель, позволяющая оценить вероятность прогрессирования фиброза печени (развития цирроза) при хроническом гепатите С. В основу данной модели положено суммирование результатов анализа ДНК пациентов на наличие полиморфизмов генов цитокинов. Установлены генотипы, характеризующиеся выраженным и умеренным «профибротическим» действием; протективным действием в отношении развития цирроза печени. Применение изобретения позволяет выделить среди больных хроническим гепатитом С группу высокого риска развития цирроза печени, нуждающихся в интенсивной противовирусной, а в перспективе — и в антифибротической терапии [14].

Цирроз печени

В последние десятилетия резко увеличилось количество больных хроническим гепатитом, что неизбежно приводит к увеличению количества случаев цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы.

Изменения количественного и качественного состава экстрацеллюлярного коллагенового матрикса характеризуют фиброз печени. При выраженных стадиях фиброза печень содержит приблизительно в 6 раз больше экстрацеллюлярного коллагенового матрикса, чем в норме, включая коллагены, фибронектин, ундулин, эластин, ламинин, гиалуронан и протеогликаны. Известно, что в поврежденной печени основным продуцентом экстрацеллюлярного коллагенового матрикса являются звездчатые клетки. Их активация осуществляется в результате взаимодействия продуктов клеток, участвующих в воспалении: 1) активированных форм кислорода, альдегидов, IGF-1 (инсулиноподобного фактора роста-1), секретируемых поврежденными гепатоцитами; 2) PDGF, FGF (фактора роста фибробластов), TGF- β , TNF- α , IL-1, активированных форм кислорода, продуцируемых клетками Купфера/моноцитами; 3) PDGF, FGF, IL-1, TGF- β , азота оксид, ET-1 (эндотелин-1), активированных форм кислорода, продуцируемые клетками эндотелия синусоидов; 4) TNF- α , IFN- γ , секретируемых Т-лимфоцитами; 5) PDGF, TGF- β , секретируемых тромбоцитами [1]. Таким образом, одна из ведущих ролей в развитии фиброза печени принадлежит цитокинам.

Имеются данные исследования, в котором участвовали пациенты с первичным биллиар-

ным циррозом. Метод ферментного иммуноанализа определяли содержание IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ в периферической крови 96 женщин возрастом от 26 до 82 лет. Контрольную группу составили 20 здоровых женщин. Выявлено, что первичный билиарный цирроз связан с изменениями сывороточных цитокинов, коррелирующих со стадией болезни. Повышены уровни провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- α , INF- γ и противовоспалительного IL-4. Определение уровня цитокинов позволяет судить о стадии и прогнозе болезни [7].

При токсических поражениях печени у экспериментальных животных также показано изменения уровня цитокинов. Так, исследовали индукцию IL-6 на модели тетрахлорметанового гепатита у крыс. После внутривентриального введения CCl₄ в 50% кукурузном масле в дозе 1.0 мл/кг веса, уровень IL-6 значительно был увеличен в плазме и его пик наблюдали на 4 ч эксперимента. Уровни TNF- α and IL-1 β кратковременно достигали пика на 4 ч эксперимента и затем уменьшались, но потом возрастали, достигая максимума на 24 ч. Уровень IL-10 быстро снижался к 4 ч, но позже увеличивался, достигая второго пика на 24 ч. Активность АЛАТ и сорбитол дегидрогеназы отмечалась максимальная на 24 ч эксперимента. Уровень IL-6 в перитонеальном экссудате увеличивался одновременно с плазменным уровнем IL-6. Эти данные необходимо принимать во внимание при анализе результатов, полученных на модели повреждения печени CCl₄ [30].

В опытах на мышах в условиях хронической печеночной недостаточности, индуцированной введением CCl₄ (0.07 мл/100 г, через день) в течение 6 недель, наблюдали, наряду с повышением уровня МДА в течение всего экспериментального периода, уменьшение концентрации в плазме крови IL-2, а также повышение TNF- α [27].

Таким образом, два основных патогенетических механизма — окислительный стресс и цитокин/эндотоксин опосредованное повреждение — являются общими для большинства поражений печени. Большинство типов клеток печени, в том числе клетки Купфера, гепатоциты и звездчатые клетки синтезируют или реагируют на цитокины. В ранней фазе хронической болезни печени, определенные агенты, например, вирусы, этанол и токсины, стимулируют выработку цитокинов. Клинические особенности хронической болезни печени, вызванной цитокинами, включают кахексию, холестаза, фиброз, синтез белков острой фазы воспаления и гипергаммоглобулинемию. Про-

воспалительные цитокины, такие как TNF- α и IL-6 большей частью вовлечены в холестаза и синтез белков острой фазы воспаления. В то время как, TGF- β , вырабатываемый клетками Купфера и гепатоцитами, возможно, является одним из цитокинов, вовлеченных в фиброз. У больных прогрессирующей болезнью печени, баланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами, смещен в направлении провоспалительных.

Лекарственные средства, направленные на подавление провоспалительных цитокинов, теоретически должны восстанавливать баланс между про- и противовоспалительными цитокинами. Современная гепатология пока не располагает истинным антицитокинным средством, одобренным для широкого клинического применения. В качестве лекарственных средств, способствующих нормализации метаболических процессов печени и структурно-функциональной целостности клеточных мембран гепатоцитов, широко применяются гепатопротекторные препараты. Группа гепатопротекторов весьма гетерогенна и включает вещества различного химического строения с разнонаправленным воздействием на метаболические процессы. Гепатопротекторные средства подразделяют на биофлавоноидные (флавоноиды расторопши — гепабене, легалон, карсил, гепатофальк-планта, силибор; флавоноиды других растений — хофитол, картерген, ЛИВ-52 и др.), фосфолипидные (эссенциале, фосфоглив, эсливер, эплир и др.), производные аминокислот (гептрал, гепа-мерц, цитратаргин, глутаргин и др.), селеносодержащие (селенит натрия), препараты животного происхождения (сирепар, гепатосан и др.), синтетические (антраль, тиотриазолин и др.), препараты урсодеооксихолевой кислоты, препараты других групп (например, витамины). Гепатопротекторы обладают антиоксидантным, мембраностабилизирующим, дезинтоксикационным, желчегонным, иммуномодулирующим и другими видами фармакологического действия. Выявлено, что гепатопротекторы, содержащие эссенциальные фосфолипиды, силимарин, гептрал, тиоктагид, артишок, урсодеооксихолевою кислоту, витамин Е, обладают противовоспалительным действием, обусловленным снижением продукции провоспалительных цитокинов [4, 8, 12, 13, 20].

Перспективным является выявление антицитокинной активности у известных ранее препаратов, в том числе гепатопротекторов, и создание препаратов, способных воздействовать на основные механизмы цитокин/эндотоксин опосредованного повреждения печени.

Проведен ряд исследований изучения эффективности у больных с поражением печени препаратов, регулирующих продукцию цитокинов.

Изучена эффективность применения препарата Ронколейкин, содержащего рекомбинантный IL-2, при хронических вирусных гепатитах С. Установлено значительное увеличение концентрации IL-1 α и IL-4, TNF- α и снижение содержания IFN- γ в сыворотке крови и биоптатах печени в период обострения болезни. На фоне лечения препаратом ронколейкин имелась достоверная тенденция к нормализации уровней цитокинов по сравнению с таковыми у пациентов контрольной группы, в терапию которых не был включен ронколейкин. При этом клинические и лабораторные критерии, включая биохимические тесты, также претерпевали более быстрое обратное развитие у больных, леченных препаратом Ронколейкин [16].

В настоящее время в клиническую практику вошел рекомбинантный препарат Инфликсимаб, представляющий собой химерные моноклональные мышиные антитела к TNF- α , соединенные с человеческим иммуноглобулином G1. Инфликсимаб специфически связывает человеческий TNF- α , что приводит к активации комплемента и цитолизу клеток воспалительного инфильтрата через механизм антителозависимой цитотоксичности. Кроме того, инфликсимаб усиливает апоптоз активированных Т-лимфоцитов путем увеличения синтеза гена-регулятора апоптоза. Клиническая эффективность инфликсимаба основана, возможно, также и на влиянии на продукцию IL-2 и IFN- γ . Показания к применению препарата инфликсимаб являются ревматоидный артрит, болезнь Крона [3]. В двух пилотных исследованиях был показан благоприятный эффект у больных с алкогольным гепатитом препарата инфликсимаб [28, 29]. Однако другое рандомизированное контролируемое двойное слепое исследование у больных с алкогольной болезнью печени было завершено досрочно из-за высокой частоты инфекций и смертности в группе больных, получавших инфликсимаб [6].

Другой подход для уменьшения циркуляции TNF- α основан на применении пентоксифиллина при поражениях печени. Известно, что пентоксифиллин ингибирует продукцию ряда цитокинов (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 и IFN). Антицитокинный эффект пентоксифиллина, согласно данным экспериментальных и клинических исследований, обуславливает его благоприятные эффекты при различных заболеваниях, например сепсисе и ревматоидном

артрите. Указанное послужило основанием и для изучения препарата при алкогольных и неалкогольных гепатитах [17].

Эффективность пентоксифиллина, показанная в экспериментальных и пилотных клинических исследованиях, была убедительно подтверждена результатами рандомизированного плацебо-контролируемого исследования с участием 101 пациента с тяжелым алкогольным гепатитом. Продемонстрировано существенное (на 40 %) снижение краткосрочной смертности под влиянием пентоксифиллина, что, по-видимому, обусловлено способностью препарата предотвращать развитие гепаторенального синдрома. При лечении пентоксифилином наблюдалось снижение уровня TNF- α . Исследователи считают, что действие пентоксифиллина при алкогольном гепатите может быть связано не только с угнетением продукции TNF- α , но и с другими фармакологическими эффектами препарата, в частности, его благоприятное влияние на микроциркуляцию и оксигенацию тканей [22].

L.A. Adams представил результаты исследования эффективности пентоксифиллина при неалкогольном стеатогепатите, патогенез которого имеет много общего с алкогольной болезнью печени. Препарат назначался в дозе 400 мг 4 раза в день в течение 12 месяцев. Констатировано достоверное снижение ферментов цитолиза (АлАт, АсАт). Недостатком пентоксифиллина была довольно высокая частота желудочно-кишечных побочных реакций, прежде всего тошноты, явившихся причиной прекращения лечения у относительно большого числа пациентов [21].

Представляет интерес изучение эффективности транс-ретиноевой кислоты при тетра-хлорметановом циррозе печени у животных. Были проведены гистологические исследования и измерен уровень TGF- β 1 и IL-6 в ткани печени. СС₁-индуцированный фиброз печени был менее выражен по результатам гистологических исследований при введении транс-ретиноевой кислоты. Введение транс-ретиноевой кислоты уменьшило выработку TGF- β 1, IL-6 и коллагена. Применение транс-ретиноевой кислоты может быть новым подходом в лечении фиброза печени [25].

Исследования препаратов, корректирующих цитокиновый баланс при поражениях печени, продолжают. Целесообразен поиск лекарственных средств, направленных на подавление провоспалительных цитокинов, а также не оказывающих отрицательного воздействия на ЖКТ и не вызывающих увеличения инфекци-

онных поражений. С учетом преимуществ препаратов растительного происхождения практический интерес представляет разработка фитопрепаратов, регулирующих продукцию цитокинов. Такой подход реализован в приведенных ниже исследованиях.

Исследовали эффективность байкалина, выделенного из корня шлемника *Scutellariae Radix*, при CCl_4 -индуцированном повреждении печени у мышей. Мыши получали интраперитонеально 0.5 мл/кг CCl_4 , и различные группы получали 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг байкалина. Через 24 ч после введения CCl_4 наблюдали повышение уровня аминотрансфераз, перекисного окисления липидов в сыворотке крови, в то время как содержание глутатиона в печени было снижено. Эти изменения были ослаблены байкалином. Гистологические исследования показали, что байкалин препятствовал портальному воспалению, некрозу и гиперплазии клеток Купфера, являющимся основными нарушениями CCl_4 -индуцированного повреждения печени. Сывороточный уровень и mRNA экспрессия TNF- α были заметно увеличены на фоне CCl_4 , но ингибированы байкалином. Эффект байкалина связывают с его влиянием на провоспалительные медиаторы [26].

На модели тетрахлорметанового гепатита куркумин уменьшал уровень АсАт, АлАт, щелочной фосфатазы сыворотки крови и улучшал гистологическую структуру печени. Кроме того, куркумин уменьшал оксидативный стресс, увеличивая содержание глутатиона. Куркумин эффективно уменьшал воспаление, снижая уровень провоспалительных цитокинов, в том числе IFN- γ , TNF- α и IL-6. К тому же, куркумин снижает избыток PDGF, TGF- β . Это исследование демонстрирует, что куркумин защищает печень от CCl_4 -повреждения и фиброгенеза, подавляя воспаление, оксидативный стресс. Эти результаты обеспечивают новое понимание механизма гепатопротекторного действия куркумина. Полученные результаты свидетельствуют, что куркумин, возможно, является антифиброзным агентом [23].

Таким образом, обзор доклинических и клинических данных, представленных в данной статье, указывает на значимость цитокинов в патогенезе поражений печени. Очевидна необходимость регуляции продукции цитокинов при заболеваниях печени, которая может быть осуществлена природными или нетоксичными синтетическими препаратами. На сегодняшний день среди большого арсенала лекарственных средств можно выделить ряд препаратов, которые хотя и не могут быть названы в полной

мере антицитокинными, но дополнительно к своим основным эффектам способны влиять цитокин/эндотоксин опосредованное повреждение печени. Неполный перечень этих средств включает эссенциальные фосфолипиды, силимарин, гептрал, тиоктацид, препараты артишока, урсоедоксихолевую кислоту, витамин E, пентоксифиллин и др.

Выводы

1. Определение цитокинового спектра при заболеваниях печени различной этиологии имеет прогностическое значение, так как позволяет судить об активности заболевания, его прогрессировании, а также об эффективности проводимой терапии.

2. Актуальной задачей является выявление способности влияния на баланс цитокинов известных ранее препаратов, в том числе гепатопротекторов, и поиск новых препаратов, регулирующих продукцию цитокинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабак О.Я. Проблема фиброгенеза неалкогольной жировой болезни печени // Сучасна гастроентерологія. — 2007. — № 4. — С. 4-10.
2. Белобородова Э.И., Дунаева Л.Е., Белобородова Е.В. Клинико-морфологические особенности течения хронических вирусных гепатитов в зависимости от иммуногенетического статуса больных // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, копрологии. — 2007. — № 3. — С. 46-51.
3. Белоусова Е.В. Инфликсимаб — новый этап в лечении болезни Крона // Фарматека. — 2002. — № 9. — С. 12-16.
4. Буеверов А.О. Место гепатопротекторов в лечении заболеваний печени // Рус. мед. журн. — 2001. — Т. 3, № 1. — С. 16-19.
5. Буеверов А.О., Маевская М.В. Некоторые патогенетические и клинические вопросы неалкогольного стеатогепатита // Клинические перспективы в гастроэнтерологии, гепатологии. — 2003. — № 3. — С. 2-7.
6. Буеверов А.О., Секачева М.И. Терапевтические возможности влияния на баланс цитокинов при заболеваниях кишечника и печени // Рус. мед. журн. — 2005. — № 1. — С. 40-43.
7. Голованова Е.В., Ильченко Л.Ю., Царегородцева Т.М. Цитокины при первичном билиарном циррозе // Терапевт. архив. — 2004. — № 2. — С. 8-11.
8. Ивашкин В.Т., Маевская М.В. Новый взгляд на эссенциальные фосфолипиды // Рус. мед. журн. — 2004. — Т. 12, № 12. — С. 689-693.
9. Коротчаева Ю.В., Самоходская Л.М., Сперанский А.И. Прогностическое значение определения ИЛ-6 в сыворотке крови и цитохрома P450 в ткани печени у больных хроническим гепатитом С // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, копрологии. — 2008. — № 2. — С. 18-21.
10. Интерлейкины при хроническом вирусном гепатите / Логвинов А.С., Царегородцева Т.М., Зотина М.М. и др. // Терапевтический архив. — 2001. — № 2. — С. 17-20.
11. Цитокиновая система при неалкогольном стеатогепатите / Маммаев С.Н., Багомедова Н.В., Богомолов П.О. и др. // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, копрологии. — 2007. — № 4. — С. 14-17.
12. Минушкин О.Н. Некоторые гепатопротекторы в лечении заболеваний печени // Лечащий врач. — 2002. — № 6. — С. 55-58.

13. Оковитый С.В. Клиническая фармакология гепатопротекторов. - Фарминдекс Практик, 2002. - Вып. 3.
14. Патент 2317335 РФ, МКИ С12Q 1/68, С12N 15/24. Способ прогнозирования прогрессирующего течения хронического гепатита с (развития цирроза печени) путем анализа комбинации полиморфизмов генов цитокинов / ООО Университетская медицина (Россия). - № 2006127392; Заявл. 28.07.2006; Опубл. 20.02.2008.
15. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. - 2004. - № 2. - С. 5-9.
16. Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В. Цитокинотерапия рекомбинантным интерлейкином 2 (ронколейкином) больных хроническим вирусным гепатитом // Цитокины и воспаление. - 2002. - № 4. - С. 8-12.
17. Ушкалова Е.А. Пентоксифиллин при алкогольных и неалкогольных поражениях печени // Фарматека. - 2006. - № 9. - С. 6-11.
18. Хазанов А.И. Острый алкогольный гепатит: клиника, диагностика и лечение // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии - 2007. - № 3. - С. 3-13.
19. Цитокиновый профиль у больных хроническими вирусными гепатитами с фиброзом и циррозом печени / Черных Е.Р., Старостина Н.М., Леплина О.Ю. и др. // Медицинская иммунология. - 2006. - Т. 8, № 4. - С. 539-546.
20. Роль альфа-липоевой кислоты (тиоктазида) в терапии метаболических заболеваний печени / Яковенко Э.П., Яковенко А.В., Григорьев П.А. и др. // Фарматека. - 2005. - № 3. - С. 7-12.
21. A pilot trial of pentoxifylline in nonalcoholic steatohepatitis / Adams L.A., Zein C.O., Angulo P. et al. // Am. J. Gastroenterol. - 2004. - Vol. 99. - P. 2356-2358.
22. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial / Akriviadis E, Botla R, Briggs W. et al. // Gastroenterology. - 2000. - Vol. 119. - P. 1637-1648.
23. Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation / Fu Y, Zheng S, Lin J. et al. // Mol. Pharmacol. - 2008. - Vol. 73. - P. 399-409.
24. Herbert Tilg, Diehl A.M. Cytokines in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis // NEJM. - 2000. - Vol. 343. - P. 1467-1476.
25. All-trans-retinoic acid ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice through modulating cytokine production / Hisamori S., Tabata C., Kodakawa I. et al. // Liver Int. - 2008. - Vol. 5. - P. 267-273.
26. Protective effect of baicalin against carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice / Park S.W., Lee C.H., Kim I.S. et al. // J. Pharmacol. Sci. - 2008. - Vol. 106. - P. 136-143.
27. Shi Yan Sheng Wu Xue Bao. Changes of some immunemediators in CCl₄-induced liver injury mice // J. Pharmacol. - 2004. - Vol. 37. - P. 50-54.
28. Combination of steroids with infliximab or placebo in severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled pilot study / Spahr L., Rubbia-Brandt L., Frossard J.L. et al. // J. Hepatol. - 2002. - Vol. 37. - P. 448-455.
29. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis / Tilg H., Jalan R., Kaser A. et al. // J. Hepatol. - 2003. - Vol. 38. - P. 419-425.
30. Zuinen R, Yamaji K, Aoki M. Early induced, high-level interleukin-6 expression in the rat peritoneal cavity into which a hepatotoxicant carbon tetrachloride was administered // Toxicol Lett. - 2007. - Vol. 170. - P. 42-50.

Резюме

Літвінова О.В.

Фармакологічна регуляція балансу цитокинів при захворюваннях печінки

В огляді обговорюється порушення балансу прозапальних і протизапальних цитокинів при патології печінки різної етіології. Охарактеризовано препарати, що регулюють продукцію цитокинів при захворюваннях печінки. Продемонстровано перспективність розробки вітчизняних препаратів, що впливають на цитокін/ендотоксин опосередковане пошкодження печінки.

Summary

Litvinova E.V.

Pharmacological regulation of cytokines balance at liver diseases (review)

In the review the abnormalities of the balance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines at the pathology of the liver of different etiology was discussed. Preparations, which regulated production of cytokines at liver diseases, were described. An availability of the development of domestic preparations, influencing on cytokine/endotoxin mediated liver injuries, was shown.

Литвінова Елена Вячеславна. Окончила Харківський державний університет (1995) і Межотраслевої інститут підвищення кваліфікації кадрів по спеціальності «Інтелектуальна собствениць» (2005). Роботає в ГП ГНЦЛС (с 1995). Ст. науч. сотрудник сектора патентно-лицензійної роботи. К.б.н. (2000).

Історія вітчизняної фармації

К 85-летию со дня рождения Конева Федора Андреевича (1924-2005)



8 марта 2009 года исполнилось 85 лет со дня рождения известного ученого в области фармации, доктора фармацевтических наук, профессора, бывшего директора ГП ГНЦЛС Федора Андреевича Конева.

Ф.А. Конев родился в 1924 году в с. Сырцево Ивнянского района Курской области.

Федор Андреевич был участником Великой Отечественной войны, по ее окончании поступил в Харьковский фармацевтический институт, который окончил в 1949 году.

С 1949 года работал в Харьковском научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте (ХНИХФИ) Министерства здравоохранения СССР. Он прошел большой путь становления ученого, занимая последовательно должности лаборанта, младшего и старшего научного сотрудника.

В этот период в институте формируются новые научные направления, одним из которых являлось создание новых готовых лекарственных форм и технологий их производства. Федор Андреевич работал в области создания новых технологий инъекционного производства. Им исследованы многие фильтрующие материалы, созданы новые технологические принципы фильтрации инъекционных растворов и знаменитый фильтр «ХНИХФИ», который в настоящее время вошел в учебники по фармтехнологии.

При непосредственном участии Конева Ф.А. созданы технологии инъекционных препаратов

сердечных гликозидов, папаверина, глюкозы с аскорбиновой кислотой и других лекарственных средств с использованием стабилизирующих приемов в технологическом процессе, а именно - ампулирование инъекционных растворов в инертной среде.

В 1960 году была создана лаборатория фармацевтической химии, из которой затем созданы лаборатория таблетированных лекарственных средств и отдел инъекционных лекарственных средств (ИЛС). С 1973 года по 1990 год отдел ИЛС возглавлял Конев Ф.А., одновременно до 1977 года занимая должность заместителя директора по научной работе.

Большим достижением лаборатории и лично Федора Андреевича было создание впервые в мировой практике пароконденсационного способа очистки первичной упаковки с применением автоматизированной схемы производства.

В эти годы появилось новое направление в работе технологических лабораторий — создание оборудования для заводов отрасли. Такие работы проводились совместно с СПКБ Медпром г. Ленинград и ОЗ ХНИХФИ. В результате были созданы автоматизированная фильтрационная система, установка для однократной термической и многократной пароконденсационной мойки ампул и флаконов, машина для резки капилляров спаренных ампул.

Совместно с ОЗ ХНИХФИ разработан промышленный образец установки для получения дистиллированной воды, полуавтомат для закатки мелкоемких флаконов (глазные капли), прибор для контроля частиц в инъекционных растворах (совместно с СПКБ Медпром г. Ленинград).

Федор Андреевич в 1955 году успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему «Исследование процесса фильтрации в производстве инъекционных растворов», а в 1970 году — докторскую диссертацию «Исследования в области технологии производства растворов для инъекций», затем стал профессором.

Наряду с успешной научной и производственной деятельностью Конев Ф.А. уделял много внимания партийно-политической и общественной работе, являясь секретарем партий-

ной организации института, членом партбюро, председателем местного комитета.

В 1977 году Федор Андреевич Конев был назначен директором института. Большой организаторский опыт и неиссякаемая энергия во многом способствовали превращению института в ведущее научно-исследовательское учреждение нашей отрасли.

За успешную деятельность ХНИХФИ как головного института подотрасли Минмедпром СССР в 1978 году присвоил институту 1 категорию и новое название — Всесоюзный научно-исследовательский институт химии и технологии лекарственных средств (ВНИИХТЛС). В этом была большая заслуга директора института Федора Андреевича Конева.

Выполняя функции головного института, ВНИИХТЛС под руководством Конева Ф.А. систематически проводил координационные совещания с участием представителей заводов подотрасли, институтов АМН СССР, а также некоторых вузов, на которых обсуждались результаты научных разработок, намечались перспективные направления работ по созданию лекарственных средств.

Большое внимание Федор Андреевич уделял подготовке научных кадров. В 1978 году при ВНИИХТЛС был создан специализированный Совет по защите кандидатских и докторских диссертаций.

По инициативе ВНИИХТЛС под руководством Конева Ф.А. в 1986 году было создано первое в Украине научно-производственное объединение «НПО «Здоровье» в которое вошли ХФЗ «Здоровье трудящимся», «Красная звезда», Луганский и Днепропетровский ХФЗ, а также Харьковский завод медпластмасс и стоматологических материалов. НПО просуществовало недолго - до 1988 года.

Не очень удался первый шаг применения мирового опыта по объединению в крупнейшие национальные корпорации, в то время как в мире, несмотря на научную и производственную мощь отдельных компаний, происходил процесс слияния многих из них. Правопреемником НПО «Здоровье» стало НПО «Укрмедпром», а затем Комитет по медицинской и микробиологической промышленности.

Федор Андреевич возглавлял институт до 1989 года. Затем работал в лаборатории инфу-

зионных и ампулированных лекарственных средств главным научным сотрудником.

Под его руководством разработаны и внедрены в производство ряд оригинальных инъекционных препаратов: дитилин, витамины группы В, аскорбиновая кислота, глюкоза, дибазол, целанид, папаверина гидрохлорид, амниоцен, баралгин, сибазон и многие другие, в том числе препараты спецназначения. Его разработки внесли существенный вклад в повышение технического уровня производства инъекционных препаратов.

Научное дарование и стремление быть полезным обществу позволили профессору Ф.А. Коневу не только подготовить более 140 научных работ, в том числе две монографии, 35 авторских свидетельств на изобретения, 8 патентов на лекарственные препараты, подготовить 3 докторов и 12 кандидатов наук, но и активно заниматься общественной работой. Многие годы он был в составе редколлегии фармацевтических журналов и фармацевтических обществ СССР и Украины. Результаты его научных исследований публиковались в ведущих журналах СССР.

Родина по достоинству оценила ратные подвиги и труд Ф.А. Конева, наградив его Орденом Отечественной войны и многими боевыми медалями, а также орденом Трудового Красного Знамени, орденом «Знак Почета» и медалями ВДНХ.

Более 50 лет профессор Ф.А. Конев трудился в нашем центре.

Коллектив центра высоко ценил и уважал его как внимательного, отзывчивого и чуткого сотрудника, хорошего организатора, воплощающего в жизнь свои идеи и научные замыслы. За трудолюбие и целеустремленность, скромность и порядочность он пользовался заслуженным авторитетом среди специалистов и ученых Украины и стран СНГ.

Мы всегда будем помнить Федора Андреевича как крупнейшего и талантливого ученого, организатора и руководителя отечественной фармацевтической науки, организатора практической фармации, воспитателя и учителя фармацевтических кадров, чуткого и внимательного в отношении к подчиненным и окружающим людям.

*Сотрудники ГП ГНЦЛС
Сотрудники ГП ГП УНФЦКЛС
Редакция журнала «Фармаком»*

К 80-летию со дня рождения Борисова Михаила Ивановича (1928-1979)



Михаил Иванович Борисов родился 10 сентября 1928 года в г. Киеве.

С 1929 года воспитывался в детском доме, вначале в Киеве, а с 1936 года - в селе Полтавка Бейнеткогорского района Северо-Казахстанской области. В детском доме Михаил окончил 4 класса, а в июне 1941 года в возрасте 13 лет был направлен для воспитания и работы в колхоз села Богатое Пресновского района Северо-Казахстанской области. В марте 1942 года стал посещать школу ФЗО (г. Коунрад Балхашского района Карагандинской области), по окончании которой переведен в Балхашское ремесленное училище № 5 учеником электромонтера. По окончании училища в ноябре 1944 года и до призыва в армию работал на Балхашском медеплавильном заводе электромонтером релейной службы, а позже - в центральной химической лаборатории. Одновременно окончил 7-ой класс вечерней школы рабочей молодежи. В июле 1947 года призван в ряды Советской Армии, где проходил службу до сентября 1957 года. За время службы окончил Омское военно-медицинское училище (1950) и работал фельдшером.

В 1954 году поступил на военно-фармацевтический факультет Харьковского фармацевтического института.

Награжден медалями «XXX лет Советской Армии и Флота» (1948) и «За безупречную службу» 3 степени (1958).

После расформирования военного факультета был демобилизован, получил звание лейтенанта запаса и продолжил учебу в Харьковском фармацевтическом институте, который окончил с отличием в 1959 году.

В том же году М.И. Борисов был принят на работу ассистентом кафедры организации фармацевтического дела (ОФД). Свою научно-педагогическую и общественную деятельность Михаил Иванович начинал в окружении таких ученых и педагогов как доценты Марта Никитична Литвиненко, Нина Ивановна Брылева и др.

За время работы на кафедре ОФД Михаил Иванович вел курс практических и семинарских занятий, приобретая навыки и осваивая методику преподавания, выполнял обязанности секретаря кафедры, являлся членом партбюро института.

С 1 декабря 1960 года Михаил Иванович зачислен в аспирантуру на кафедру фармакогнозии, где подготовил диссертацию на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук (1964). Диссертация на тему «Фитохимическое исследование подмаренника русского, верболистного и крестообразного» была защищена в специализированном Совете при Ленинградском химико-фармацевтическом институте.

С 1 декабря 1963 года М.И. Борисов продолжил педагогическую и научную деятельность в должности ассистента кафедры фармакогнозии ХФИ. Михаил Иванович с 1 сентября 1966 года исполнял обязанности доцента, а через две недели, после смерти Юлиана Галактионовича Борисюка, возглавил кафедру фармакогнозии.

За время работы в институте Михаил Иванович опубликовал 70 научных статей, получил 6 авторских свидетельств, издал книгу (Лекарственные свойства сельскохозяйственных растений / Борисов М.И., Коршиков Б.М., Макарова Г.В. и др. - Минск: Ураджай, 1974. - 336 с.).

Двадцать лет жизни Михаила Ивановича неразрывно связаны с кафедрой фармакогнозии.

Он активно занимался подготовкой специалистов - фармакогностов. Под его руководством подготовили и успешно защитили диссертации на соискание ученой степени кандидатов фармацевтических наук Журавлев Н.С. (1972), Богаевский А.К. (1972), Сербин А.Г. (1972), Султан Ахмед Сайяд (1979), Ковалев В.Н. (1979), Литвиненко М.М. (1980), Исакова Т.И. (1980).

Многие фитохимические исследования Михаила Ивановича и его учеников проводились на базе лабораторий ВНИИХТЛС (ХНИХФИ) и в сотрудничестве с его сослуживцами по военно-фармацевтическому факультету. Поэтому Михаил Иванович имел тесные дружеские и научные связи с нашим Научным Центром.

На базе ВНИИХТЛС М.И. Борисов подготовил докторскую диссертацию на тему «Фитохимическое исследование растений семейства мареновых и других семейств» и представил к защите в спецсовет нашего института.

Значительное время и внимание Михаил Иванович уделял общественной и административной работе. На протяжении ряда лет он был командиром добровольной народной дружины ХФИ, куратором академических групп, неоднократно избирался членом и председателем комиссии партийного бюро по контролю учебно-методической работы в институте, был членом

редколлегии «Фармацевтического журнала» и республиканского межведомственного сборника «Фармация». В 1967 году М.И. Борисова избрали заместителем секретаря партбюро ХФИ по организационной работе, а в 1968 году - секретарем.

В 1976 году Михаила Ивановича назначили проректором по связям с практическим здравоохранением и внедрению в практику научных достижений сотрудников ХФИ.

Вся биография М.И. Борисова свидетельствует о его целеустремленности и предопределенности пути: химическая лаборатория - вечерняя школа - медицинское училище - военно-фармацевтический факультет - институт - аспирантура - научно-педагогическая деятельность ассистентом, доцентом, заведующим кафедрой. К сожалению, преждевременная кончина не позволила ему защитить докторскую диссертацию, апробация которой успешно состоялась.

Редакция журнала «Фармаком», администрация и коллектив ГП ГНЦЛС чтут светлую память Михаила Ивановича Борисова.

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 та на які спирається автор, виділення не вирішених 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 дробі, 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.